POLYPUBLIE

Mesure in vivo de l'impédance du myocarde durant l'ischémie et détermination de ses résistivités électriques intracellulaires et extracellulaires

Eric Plourde

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

Date	2002
Type	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis Mémoire de maîtrise/Master's thesis
URL de PolyPublie **PolyPublie URL**	https://publications.polymtl.ca/7015/
Conditions d'utilisation **Terms of use**	© Tous droits réservés / All rights reserved
Référence **Citation**	Plourde, E. (2002). Mesure in vivo de l'impédance du myocarde durant l'ischémie et détermination de ses résistivités électriques intracellulaires et extracellulaires [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/7015/

Détails de la thèse
Thesis details

Directeurs de recherche **Advisors**	Pierre Savard
Programme **Program**	Non spécifié

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal
https://publications.polymtl.ca

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MESURE *IN VIVO* DE L'IMPÉDANCE DU MYOCARDE DURANT L'ISCHÉMIE ET DÉTERMINATION DE SES RÉSISTIVITÉS ÉLECTRIQUES INTRACELLULAIRES ET EXTRACELLULAIRES

ERIC PLOURDE

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

(GÉNIE BIOMÉDICAL)

DÉCEMBRE 2002

©Eric Plourde, 2002.

National Library of Canada
Acquisitions and Bibliographic Services
395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale du Canada
Acquisitions et services bibliographiques
395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-81525-0

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

MESURE *IN VIVO* DE L'IMPÉDANCE DU MYOCARDE DURANT L'ISCHÉMIE ET DÉTERMINATION DE SES RÉSISTIVITÉS ÉLECTRIQUES INTRACELLULAIRES ET EXTRACELLULAIRES

présenté par: PLOURDE Eric

en vue de l'obtention du diplôme de: Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. VINET Alain, Ph. D., président
M. SAVARD Pierre, Ph. D., membre et directeur de recherche
M. GULRAJANI Ramesh, Ph. D., membre

REMERCIEMENTS

Je désire premièrement remercier mon directeur de recherche, le professeur Pierre Savard, pour son ouverture et sa grande rigueur scientifique. Je souligne également l'aide précieuse de M. Pierre Le Guyader sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour.

Des remerciements vont aussi à tout le personnel du Centre de Recherche de l'Hôpital du Sacré Cœur de Montréal, plus spécialement à Mme Caroline Bouchard, M. Bruno Dubé et M. Michel Vermeulen pour le temps précieux qu'ils ont consacré au côté expérimental de ce projet, à M. Denis Guérette, M. Pierre Rocque et M. Gilberto Sierra pour leur aide technique ainsi qu'à mes confrères et consoeurs M. Philippe Comptois, Mme Élise Jalil, M. Olivier Lareau, M. Francois Lemarbre et Mme Josée Roy.

Finalement, je désire remercier mes proches, parents et amis, pour les précieux encouragements qu'ils m'ont suscités lors de ces années études.

Ce travail fut supporté en partie par le Conseil de recherches en sciences naturelles et génie du Canada (CRSNG) et la Fondation des maladies du cœur du Canada.

RÉSUMÉ

Les maladies cardio-vasculaires sont la principale cause de mortalité au Canada parmi lesquelles l'infarctus du myocarde et ses complications figurent en tête de liste. L'infarctus provoque, dans la zone touchée, une perte du lien de communication cellulaire attribuable aux jonctions gap, c'est le découplage cellulaire. Afin d'étudier ce phénomène, qui pourrait être relié à la fibrillation, un système de mesure d'impédance *in vitro* jumelé à un modèle bidomaine anisotrope incluant les jonctions gap a été adapté et utilisé *in vivo.*

Les expériences furent menées à l'aide de 13 porcs soumis à une période d'ischémie aiguë provoquée en occluant l'artère coronaire interventriculaire antérieure (IVA) pendant 3 heures. L'impédance du myocarde (amplitude et phase) fut mesurée dans la zone ischémique à l'aide de la technique à quatre électrodes avec courant alternatif (10 Hz – 10 kHz). Puisque la distance inter-électrode est petite (340 μm), le courant à basses fréquences circule dans le milieu interstitiel alors que le courant à hautes fréquences est redirigé vers le milieu intracellulaire grâce à la capacité transmembranaire. Les paramètres du modèle bidomaine anisotrope sont optimisés à l'aide des mesures d'impédances expérimentales selon les orientations parallèle et perpendiculaire aux fibres du myocarde afin d'estimer les conductivités électriques des domaines extracellulaires et intracellulaires (incluant la conductance des jonctions gap et la capacité des disques intercellulaires).

Avant l'occlusion de l'IVA, les mesures d'impédance sont stables et les conductivités du modèle sont à l'intérieur des paramètres physiologiques. Suite à l'occlusion, cependant, l'amplitude de l'impédance augmente tel que prévu mais la phase à haute fréquence (10 kHz) subit un changement très important : un retard (5 degrés) suivi d'une période de fibrillation. Durant ce retard que subit la phase, le modèle bidomaine montre une augmentation subite des résistivités modélisant les jonctions gap (1328,4±153,8 Ω·cm à $5{,}59\text{x}10^{5}\pm1{,}95\text{x}10^{5}$ Ω·cm) suggérant l'avènement du découplage cellulaire.

Le système de mesure présenté nous permet d'étendre un peu plus loin les connaissances en ce qui a trait aux effets que produit l'ischémie sur la structure du myocarde. En effet, il nous permet de déterminer *in vivo* l'avènement du découplage cellulaire en observant les changements subis par les résistivités interstitiel, cytoplasmique et des jonctions gap durant l'ischémie. Ce système pourrait donc être utilisé lors d'autres protocoles visant l'étude du découplage cellulaire.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the principal cause of mortality in Canada among which myocardial infarction and its complications are on top of the list. Infarction results in a loss of the cellular communication link attributed to gap junctions, in other words : cellular uncoupling. To investigate cellular uncoupling, which is suspected to be linked to fibrillation, an *in vitro* impedance measurement system along with a bidomain and anisotropic model including the gap junctions was adapted and used *in vivo.*

Experiments were carried out in 13 anesthetized pigs subjected to a 3-hour acute occlusion of the left anterior descending (LAD) coronary artery. Tissue impedance (amplitude and phase) was measured over the ischemic area using a four-electrode technique with alternating current (10 Hz – 10 kHz). Since a small inter-electrode distance was used (350 μm), the current flowed only in the extracellular domain at low frequencies, whereas it was shunted into the intracellular domain through the membrane capacitance at high frequencies. The impedance values, measured both parallel and perpendicular to the myocardial fibers, were optimally fitted with an anisotropic bidomain model to estimate the electrical conductivities of the extra- and intracellular domains (including gap junction conductance and intercalated disk capacitance).

Prior to LAD occlusion, the impedance values were stable and the bidomain conductivities were in the physiological range. After occlusion, the impedance amplitude

increased as expected but the high frequency impedance phase angle (10 kHz) showed a most striking change: a sudden phase lag (+5 degrees) that was soon followed by fibrillation. During this phase lag, the bidomain model showed a drastic increase in the resistivity of the gap junctions (1328,4±153,8 Ω·cm to $5{,}59\text{x}10^{5}\pm1{,}95\text{x}10^{5}$ Ω·cm) suggesting cellular uncoupling.

The instrument presented gives us new insights into the evolution of ischemia and its effects on the structure of the myocardium. In fact, it allows the observation of cellular uncoupling *in vitro* by discriminating the time course of the interstitial, cytoplasmic and gap junction resistivities during ischemia. This system could therefore be used in further studies involving cellular uncoupling.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS iv

RÉSUMÉ v

ABSTRACT vii

TABLE DES MATIERES ix

LISTE DES TABLEAUX xiii

LISTE DES FIGURES xiv

LISTE DES ANNEXES xvi

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION 1

1.1 LE MYOCARDE 2

1.1.1 Physiologie du myocarde 2

1.1.2 Changements physiologiques reliés à l'ischémie 3

1.2 MESURES D'IMPÉDANCE ET TECHNIQUE À QUATRE ÉLECTRODES 4

CHAPITRE 2 : REVUE DE LITTÉRATURE ET MOTIVATIONS DE L'ÉTUDE 8

2.1 REVUE DE LITTÉRATURE 8

2.1.1 Mesures *in vivo* de l'impédance spécifique du myocarde durant l'ischémie 8

2.1.2 Mesures *in vitro* de l'impédance du myocarde durant l'ischémie et détermination de ses résistivités intracellulaires et interstitielles 11

2.2 MOTIVATIONS DE L'ÉTUDE 12

CHAPITRE 3 : SYSTÈME DE MESURE ET PARTICULARITÉS RELIÉES AUX MESURES *IN VIVO* 15

3.1 SYSTÈME DE MESURE *IN VITRO* 15

3.1.1 Mesure de l'impédance 15

3.1.2 Modèles bidomaines du myocarde 18

3.1.3 Détermination des résistivités à partir de l'impédance 24

3.2 PARTICULARITÉS RELIÉES AUX MESURES *IN VIVO* ET AJOUTS APPORTÉES AU SYSTÈME DE MESURE *IN VITRO* 25

3.2.1 Élimination des sources de bruits 26

3.2.2 Fixation de la sonde 27

3.2.3 Orientation de la sonde 29

3.2.4 Variations de l'impédance durant un cycle cardiaque 35

CHAPITRE 4 : DÉCOUPLAGE CELLULAIRE DURANT L'ISCHÉMIE AIGUE : MESURES D'IMPÉDANCE APPUYÉES PAR L'UTILISATION D'UN MODÈLE BIODMAINE INCLUANT LES JONCTIONS GAP 37

4.1 SITUATION DE L'ARTICLE DANS LE MÉMOIRE 37

4.2 ABSTRACT 39

4.3 CONDENSED ABSTRACT 41

4.4 INTRODUCTION 42

4.5 METHODS 43

4.5.1 Experimental preparation 43

4.5.2 Myocardial Impedance and resistivities measurements 45

4.6 RESULTS 49

4.6.1 Impedance measurements 50

4.6.2 Bidomaine parameters 53

4.7 DISCUSSION AND CONCLUSIONS 57

4.7.1 Cell-to-cell coupling and fibrillation 59

4.7.2 Limitations 60

4.7.3 Conclusions 60

4.8 ACKNOWLEDGMENST 61

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS 62

5.1 SYNTHÈSE DES RÉSULTATS 62

5.1.1 Mesures d'impédance 62

5.1.2 Paramètres bidomaines 63

5.2 INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS 64

5.2.1 Observation du découplage cellulaire 64

5.2.2 Lien entre le couplage cellulaire et la fibrillation 65

5.3 SYSTÈME DE MESURE : LIMITES ET RECOMMANDATIONS.....66

5.3.1 Limites et recommandations concernant la théorie 66

5.3.2 Recommandations concernant la sonde.....69

5.4 CONCLUSIONS 69

RÉFÉRENCES 71

ANNEXE I: GUIDE D'UTILISATION DU SYSTÈME DE MESURE D'IMPÉDANCE ET DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES DU MODÈLE BIDOMAINE ANISOTROPE INCLUANT LES JONCTIONS GAP 78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1 Impedance 53

Tableau 4.2 Bidomain model parameters 57

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Cardiomyocytes couplés à l'aide de jonction gap. 3

Figure 1.2 Technique à quatre électrodes. 6

Figure 3.1 Sonde formée de deux séries d'électrodes perpendiculaires. 17

Figure 3.2 Schéma électrique du modèle bidomaine à courant alternatif 19

Figure 3.3 Schéma électrique du modèle bidomaine à courant alternatif incluant une capacité spécifique intracellulaire. 23

Figure 3.4 Fixation de la sonde sur le cœur à l'aide d'un support 27

Figure 3.5 Distribution du potentiel $\phi_e(\omega,r)$ (mV) sur le myocarde selon différentes orientations d'injection de courant par rapport aux fibres. 30

Figure 3.6 Différences de potentiel mesurées à l'aide des électrodes perpendiculaires (—) et parallèles (---) à l'injection du courant en fonction de l'angle de rotation de la sonde par rapport aux fibres cardiaques (* orientation de la sonde parallèle aux fibres; o orientation de la sonde perpendiculaire aux fibres). 32

Figure 3.7 Carte des temps de conduction (ms). 34

Figure 4.1 Bidomain model for the longitudinal direction (r_e : interstitial resistivity; r_i : intracellular resistivity; r_c : cytoplasmic resistivity; r_{gap} : gap junction resistivity; c_d : specific capacitance of the intercalated disks; R_m and C_m : specific resistance and specific capacitance of the membrane). 47

Figure 4.2 Percentage of pigs : A, who fibrillated; B, who survived; C, for which electrical decoupling was observed with the impedance probe (n=12). 50

Figure 4.3 Amplitude and phase angle of the measured impedance in both longitudinal and transverse directions prior and up to 3 hours following LAD occlusion (n=1). (∇ : 10 kHz; × : 2.2 kHz; + : 1 kHz; * : 220Hz; ◊ : 12 Hz; H : fibrillation episode; arrow : cellular uncoupling. 51

Figure 4.4 Interstitial (r_e) and intracellular (r_i) resistivities prior and up to 3 hours after the LAD occlusion (n=1). (○ : longitudinal; □ : transverse; H : fibrillation episode; arrow : cellular uncoupling). Same animal as for Figure 4.3. 54

Figure 4.5 Intracellular parameters prior and up to 3 hours following LAD occlusion (n=1). (r_c : cytoplasmic resistivity; r_{gap} : gap junction resistivity; c_d : intercalated disk specific capacitance; N : transverse to longitudinal ratio of junction density; H : fibrillation episode; arrows : cellular uncoupling). Same animal as for Figure 4.3. 56

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I GUIDE D'UTILISATION DU SYSTÈME DE MESURE D'IMPÉDANCE ET DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES DU MODÈLE BIDOMAINE ANISOTROPE INCLUANT LES JONCTIONS GAP 78

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Selon Santé Canada, les maladies cardio-vasculaires étaient la première cause de mortalité au Canada en 1997 avec 37% de décès dont 55% étaient dus à des infarctus du myocarde (Santé Canada, 1997). L'infarctus du myocarde survient lorsqu'une région du cœur devient ischémique c'est-à-dire qu'elle ne reçoit plus d'apport sanguin dû à une occlusion de la ou des artères responsables de sa perfusion. Plus particulièrement, cette pathologie peut mener au développement de certains troubles du rythme tels que la tachycardie et la fibrillation ventriculaire par le passage d'une activité électrique normale à une instabilité métabolique, ionique et électrique propice au développement d'arythmies (Saffitz *et al.,* 1999; Kléber *et al.,* 1987).

Les mesures électriques, telles que les mesures d'impédance, permettent de caractériser les changements physiologiques mettant en jeu un déplacement d'ions. En effet, les mesures d'impédance sont utilisées depuis les années 50 et 60 afin de caractériser les tissus biologiques (Geddes et Baker, 1967; Rush *et al.,* 1963; Schwan et Kay, 1956) et, depuis les années 70, afin de caractériser plus spécifiquement le myocarde (Roberts *et al.,* 1979; Clerc, 1976; Weidmann, 1970). Parmi les premiers auteurs ayant présenté des études de mesures d'impédance tentant de caractériser le myocarde durant l'ischémie, mentionnons, entre autres, van Oosterom *et al.* (van Oosterom *et al.,* 1979), qui ont mesuré l'évolution temporelle de l'impédance durant

l'ischémie ainsi que Kléber *et al.* (Kléber *et al.*, 1987) qui se sont intéressés aux résistivités intracellulaires et interstitielles du myocarde durant l'ischémie. Ils ont tous remarqué une grande variabilité de ces paramètres.

Ce mémoire s'inscrit dans la suite de ces travaux et s'intéressera à la mesure *in vivo* de l'impédance électrique du myocarde durant l'ischémie afin de déterminer l'évolution de ses résistivités électriques intracellulaires et interstitielles. Cependant, afin d'être en mesure de définir le problème efficacement, certains points, tels que la physiologie du myocarde ainsi que les mesures d'impédance, méritent certaines explications.

1.1 LE MYOCARDE

1.1.1 Physiologie du myocarde

Le myocarde est composé principalement de cellules musculaires, les cardiomyocytes, et forme la partie contractile du cœur qui est responsable de l'éjection du sang dans les artères. Le coeur est entouré de deux couches formées principalement de tissu conjonctif, le péricarde à l'extérieur et l'endocarde à l'intérieur. Les cardiomyocytes (Figure 1.1) sont de forme allongée (200 µm x 40 µm x 40 µm) et sont reliés entre eux par des jonctions dites jonctions gap très perméables aux ions tels que le Na^+, Ca^{++} et K^+. Dans un tissu sain, les jonctions gap sont surtout situées aux extrémités des cardiomyocytes sur le site des disques intercalaires. Leur perméabilité permet la propagation très rapide du potentiel d'action qui est responsable de la dépolarisation et

de la contraction des cellules et ce, selon la direction où ces jonctions sont les plus abondantes, i.e. selon l'orientation des fibres cardiaques. La présence de ces jonctions et la forme des cardiomyocytes imposent donc au muscle cardiaque des résistivités distinctes selon les orientations parallèle (longitudinale) et perpendiculaire (transverse) aux fibres cardiaques.

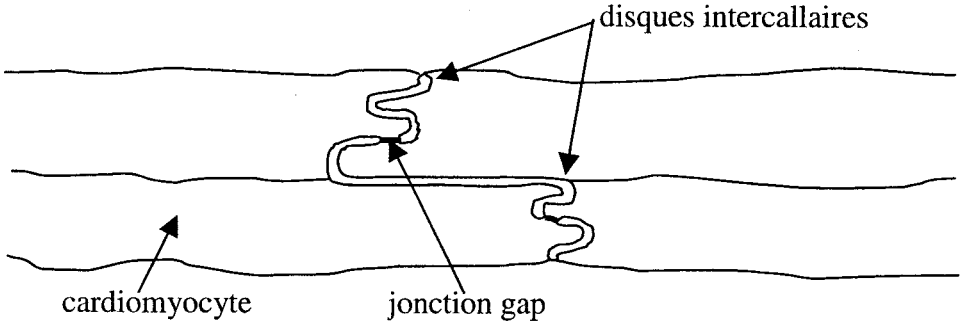


Figure 1.1 Cardiomyocytes couplés à l'aide de jonction gap.

1.1.2 Changements physiologiques reliés à l'ischémie

Le myocarde est le site de plusieurs changements physiologiques durant l'ischémie. En effet, les premières minutes suivant l'arrêt de la perfusion sont marquées par une production d'acide lactique (Rovetto *et al.,* 1975) et une augmentation du K^+ extracellulaire (Hill et Gettes, 1980). Le tissu devient alors propice à une plus grande excitabilité et à une dépolarisation plus rapide. De plus, une perte de la tension développée est observée (Weiss et Shine, 1982). Après quelques minutes, une seconde phase de perte de K^+ intracellulaire survient (Hill et Gettes, 1980), de même qu'une augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire (Steenbergen *et al.,* 1987) et un découplage cellulaire (Kléber *et al.,* 1987), c'est-à-dire une perte du lien de moindre

résistivité unissant les cellules les unes aux autres. Le découplage cellulaire se produit en réaction à une augmentation de la résistance des jonctions gap qui serait due à une accumulation de Ca^{2+} intracellulaire (Noma et Tsuboi, 1987), à l'accumulation de métabolites lipidiques intracellulaires (Wu *et al.,* 1993) ainsi qu'à la réduction d'ATP intracellulaire (Sugiura *et al.,* 1990). Ces nombreux changements de concentrations ioniques survenant durant l'ischémie sont responsables des modifications que subissent les gradients de potentiel extracellulaire observables sur des électrogrammes sous forme d'une dépression du segment ST (Zmyslinski *et al.,* 1979). Également, Tranum-Jensen *et al.* (Tranum-Jensen *et al.,* 1981) rapportent une augmentation du volume des cellules présentes dans une région ischémique. En effet, après une heure d'occlusion, le volume d'eau augmente de 16,5%.

Tel que stipulé dans l'Introduction, puisque ces changements physiologiques impliquent des modifications dans les concentrations et les échanges d'ions, ils sont observables grâce à des mesures d'impédance dont nous discuterons à la section suivante.

1.2 MESURES D'IMPÉDANCE ET TECHNIQUE À QUATRE ÉLECTRODES

La résistance (R) d'un conducteur est le rapport entre la différence de potentiel (V) aux bornes de ce conducteur et l'intensité du courant (I) qui le traverse ($R=V/I$). Alors que la résistance dépend de la géométrie de la structure étudiée, la résistance spécifique, qu'on appelle résistivité (ρ, [$\Omega \cdot m$]), ne dépend pas de cette géométrie et est

une propriété intrinsèque du milieu. Par exemple, pour un conducteur isotrope de forme cylindrique, la résistance s'exprime en fonction de la résistivité à l'aide de l'équation $R=\rho l/A$ où l est la longueur du conducteur étudié et A l'aire de la section de ce conducteur. On préfère parfois parler de conductivité (σ, [S/m]) plutôt que de résistivité qui sont simplement l'inverse l'un de l'autre ($\sigma=1/\rho$).

Lorsqu'une fonction de potentiel sinusoïdale V produit un courant I qui n'est pas en phase avec cette dernière, on appelle le rapport V/I l'impédance électrique ($Z=V/I=R+jX$) du milieu. L'impédance est constituée de la résistance ainsi que d'un facteur supplémentaire, la réactance (X), afin de tenir compte de ce changement de phase. De même que la résistance peut s'exprimer en fonction d'une résistance spécifique, ou résistivité, l'impédance peut également s'exprimer en fonction d'une impédance spécifique.

La technique la plus couramment utilisée afin d'effectuer des mesures d'impédance est la technique dite à quatre électrodes (Wang *et al.,* 1998; Cinca *et al.,* 1997; Smith *et al.,* 1995; Steendijk *et al.,* 1993). Elle met en jeu quatre électrodes équidistantes et alignées (Figure 1.2). Les deux électrodes les plus éloignées injectent un courant dans le milieu d'intérêt et la différence de potentiel produite par ce courant est mesurée par les deux électrodes centrales. Puisque cette technique utilise des électrodes distinctes afin d'injecter le courant et de mesurer la différence de potentiel, elle élimine presque entièrement les problèmes de polarisation et d'impédance de

contact présents avec les techniques à deux électrodes telles que le pont d'impédance (Rush *et al.*, 1963).

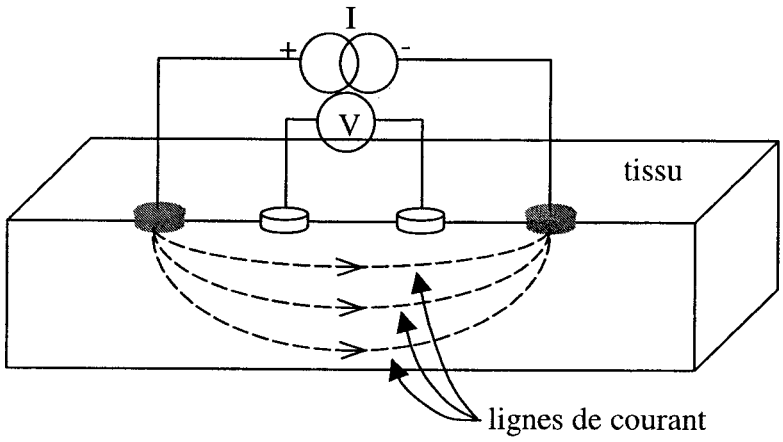


Figure 1.2 Technique à quatre électrodes.

Le chapitre suivant consistera en une revue de la littérature concernant les mesures *in vivo* et *in vitro* d'impédance et de résistivité du myocarde durant l'ischémie. Cette revue sera suivie des principales motivations qui soutiennent cette étude, entre autres, l'étude du phénomène de découplage cellulaire durant l'ischémie.

Au chapitre 3 sera présenté le système de mesure d'impédance qui a été utilisé de même que les modifications qui ont dû lui être apportées. En effet, le système original avait été créé afin d'effectuer des mesures dans un environnement *in vitro* alors que cette étude se situe dans un environnement *in vivo*. Des facteurs tels que le mouvement dû au

battement du cœur et les bruits dus aux différents appareils présents dans une salle d'opération ont nécessité certaines adaptations.

Le chapitre 4 traitera de la partie maîtresse de ce mémoire, soit la mesure *in vivo* d'impédance et la détermination des résistivités du myocarde durant l'ischémie chez l'animal. Il sera présenté sous forme d'un article soumis pour publication. En quelques lignes, une sonde d'impédance, utilisant la technique à quatre électrodes, a été fixée sur le cœur et un modèle bidomaine anisotrope a été utilisé afin de calculer les différentes résistivités du myocarde incluant la résistivité des jonctions gap. Ce modèle a entre autres permis de démontrer l'avènement du phénomène de découplage cellulaire. Ce chapitre présentera donc la méthodologie utilisée, les principaux résultats obtenus ainsi qu'une discussion les concernant.

Le dernier chapitre reprendra les principaux éléments de résultats et de discussion de l'article qui seront complétés par des suggestions concernant l'évolution du système de mesure en vue d'en faire un système opérable en toutes circonstances ainsi que par une conclusion.

CHAPITRE 2

REVUE DE LITTÉRATURE ET MOTIVATIONS DE L'ÉTUDE

2.1 REVUE DE LITTÉRATURE

De nombreux chercheurs ont tenté de caractériser les changements physiologiques subis par le myocarde durant l'ischémie à l'aide de l'impédance et des différentes résistivités du myocarde. Ces recherches feront l'objet de ce chapitre. Nous discuterons premièrement des mesures effectuées dans un environnement *in vivo* et ensuite des mesures effectuées dans un environnement *in vitro*. Ce chapitre sera clôturé par la présentation, éclairée par cette revue de littérature, des motivations de ce mémoire.

2.1.1 Mesures *in vivo* de l'impédance spécifique du myocarde durant l'ischémie

Plusieurs auteurs rapportent des mesures *in vivo* d'impédance durant l'ischémie. Déjà en 1979, van Oosterom *et al.* (van Oosterom *et al.,* 1979) rapportent des mesures *in vivo* effectuées sur 3 chiens. Ils mesurent l'impédance transmurale, c'est-à-dire entre l'épicarde et l'endocarde, à l'aide de la technique à quatre électrodes et d'une injection de courant alternatif (1 kHz) de 10 μA. L'impédance spécifique est définie par van Oosterom comme étant $\rho=Z\lambda d$ où Z est l'impédance mesurée, d est la distance inter-électrode et λ est une constante propre à chaque sonde et peut être obtenue à l'aide de calibration dans différentes solutions salines d'impédance connue. En moyenne, ils

remarquent une augmentation, relativement linéaire, de l'impédance spécifique entre le début de l'occlusion (~450 Ω·cm) et la fin du protocole (~1250 Ω·cm) 165 minutes plus tard.

Une étude plus complète est ensuite effectuée par Fallert *et al.* (Fallert *et al.*, 1993) sur 39 moutons. Ils utilisent également la technique à quatre électrodes en injectant un courant de 15 µA à 1 kHz mais posent leurs électrodes à la surface de l'épicarde plutôt que de les faire pénétrer dans le tissu tel que van Oosterom. De plus, ils les orientent selon le grand axe du cœur afin de réduire l'effet de l'anisotropie sur les mesures. Ils rapportent une impédance spécifique contrôle ($\rho=Z\lambda d$) beaucoup plus faible que van Oosterom soit 158±26 Ω·cm mais remarquent toutefois la même forme d'augmentation progressive de l'impédance spécifique. Cette dernière atteint cependant un maximum (~650 Ω·cm) après seulement 60 minutes d'occlusion et, de plus, subit une diminution progressive à partir de la 80$^{\text{ième}}$ minute d'occlusion qui dure jusqu'à la fin du protocole de 4 heures pour atteindre alors ~400 Ω·cm. Ils effectuent également des mesures à des fréquences de 5 kHz et 15 kHz. Ils rapportent les mêmes types de changements temporels que pour une fréquence de 1 kHz avec, cependant, des maximums beaucoup plus faibles après 60 minutes (respectivement ~425 Ω·cm et ~350 Ω·cm) et des impédances finales également plus faibles (~325 Ω·cm et ~280 Ω·cm).

Smith *et al.* (Smith *et al.,* 1995) mesurent l'impédance du myocarde chez le porc en utilisant la même définition d'impédance spécifique que van Oosterom et en alignant les quatre électrodes de façon parallèle à l'orientation des fibres cardiaques (courant de 10 μA, fréquence non spécifiée). La force de l'expérimentation de Smith *et al.* repose dans le fait qu'ils effectuent des mesures d'impédance successivement à toutes les 15 secondes, 30 secondes et 60 secondes pendant 1 heure plutôt qu'à toutes les 5 minutes tel que Fallert *et al.* Ils sont alors en mesure d'observer des changements imperceptibles pour Fallert *et al.* En effet, à partir d'une impédance spécifique contrôle de 187±120 Ω·cm, ils rapportent une première augmentation de 130% à 150% durant les 3 premières minutes d'occlusion, suivie d'un plateau durant les 10 à 12 minutes suivantes et d'une seconde augmentation allant jusqu'à 270% après 60 minutes d'occlusion. De plus, ils sont en mesure d'établir un lien entre la seconde augmentation de l'impédance, qu'ils assimilent au découplage cellulaire, et une phase d'arythmie (phase Ib (Kaplinsky *et al.,* 1979)) survenant de 12 à 30 minutes après le début de l'occlusion.

Finalement, Cinca *et al.* (Cinca *et al.,* 1997) effectuent le même type d'expérimentation (courant de 10 μA, fréquence de 1110 Hz) que Smith *et al.* et rapportent des résultats semblables à ce dernier. Ils observent, cependant, que le préconditionnement, c'est-à-dire la pratique d'une pré-occlusion, retarde la seconde phase d'augmentation d'impédance. De plus, ils stipulent que la phase de l'impédance pourrait subir des modifications plus importantes lors du découplage cellulaire que la mesure de l'amplitude de l'impédance utilisée habituellement comme marqueur du

découplage cellulaire. En effet, ils avancent que l'amplitude de l'impédance est une mesure à la fois du milieu intracellulaire et interstitiel mais, par contre, que la phase, qui n'est modifiée que par les éléments capacitifs, ne serait affectée que par la fraction du courant traversant la membrane cellulaire, et permettrait d'observer plus spécifiquement le découplage cellulaire.

2.1.2 Mesures *in vitro* de l'impédance du myocarde durant l'ischémie et détermination de ses résistivités intracellulaires et interstitielles

Kléber *et al.* (Kléber *et al.,* 1987), en 1987, ont mesuré l'évolution temporelle de l'impédance durant l'ischémie à l'aide de préparations *in vitro* de muscles papillaires de lapin et de la technique à quatre électrodes. Due à la géométrie des muscles papillaires, ils ont été en mesure d'utiliser un modèle électrique de câble qui est une représentation, en une dimension, de fibres ayant une géométrie cylindrique (voir Gulrajani (1998)). Cela leur a permis de calculer, à partir de l'impédance mesurée dans le sens des fibres musculaires, une résistivité intracellulaire longitudinale (r_{il}) ainsi qu'une résistivité interstitielle longitudinale (r_{el}).

À partir d'une résistivité longitudinale globale (r_l) obtenue dans un tissu non ischémique (contrôle) de 97 Ω·cm, ils rapportent des résistivités interstitielle et intracellulaire longitudinales de r_{el}=70 Ω·cm et r_{il}=115 Ω·cm. Après avoir pratiqué une occlusion, ils remarquent une augmentation immédiate de r_{el} de 30%, suivie d'une progression plus lente pour atteindre 80% après 20 minutes d'occlusion.

L'augmentation brusque de r_{el} ne serait pas attribuable, selon Kléber *et al.*, à des changements métaboliques mais plutôt à une diminution de la pression de perfusion ainsi qu'à une diminution du volume intravasculaire. L'augmentation subséquente, plus lente, de r_{el} pourrait, quant à elle, être due à une diminution du volume interstitiel. Pour ce qui est de r_{il}, elle demeure relativement constante durant les 10 à 12 premières minutes suivant l'occlusion, mais subit un changement drastique à des temps variant entre 12 et 18 minutes après l'arrêt de la perfusion pour augmenter de 200% en moins de 5 minutes. Cette augmentation, telle que la seconde augmentation de l'impédance spécifique, serait le reflet du découplage cellulaire.

La même méthode est également utilisée par Cascio *et al.* (Cascio *et al.*, 1990) quelques années plus tard. Ils rapportent des résultats similaires à ceux de Kléber *et al.* Cependant, en plus, ils observent que l'augmentation de r_{il} survient en même temps que la seconde augmentation de K^+ extracellulaire qu'ils associent donc également au découplage cellulaire. Ils rapportent aussi que la résistivité longitudinale globale (r_l) atteint un plateau, environ 250% de la valeur contrôle, après 30 minutes d'occlusion.

2.2 MOTIVATIONS DE L'ÉTUDE

Tel qu'énoncé par Cinca *et al.*, la mesure de la phase de l'impédance pourrait être un meilleur marqueur du découplage cellulaire que l'amplitude. Or, très peu d'études présentent des mesures de phase durant l'ischémie et aucune n'a investigué la relation entre de telles mesures et le découplage cellulaire.

Deuxièmement, toutes les études *in vivo*, dû à l'absence de modèle adéquat du tissu sous-jacent ou à l'inaccessibilité à des tissus de géométries simples tel que le muscle papillaire, se sont limitées à des mesures d'impédance globale et n'ont présenté aucune valeur de résistivités intracellulaires et interstitielles. En effet, parmi toutes les expérimentations présentées précédemment, seulement celles de Kléber *et al.* et de Cascio *et al.* présentent des résultats des résistivités interstitielles et intracellulaires et furent obtenues à l'aide de préparations *in vitro*. De plus, aucune étude ne modélise les jonctions gap, l'évolution de la résistivité de ces jonctions durant l'ischémie est donc inconnue, et aucune étude d'envergure n'est effectuée sur des mesures d'impédance et de résistivités durant l'ischémie dans l'orientation perpendiculaires aux fibres cardiaques.

Dans un premier temps, cette étude vise donc à étudier la relation entre la phase et le découplage cellulaire à l'aide de mesures *in vivo* d'impédance. Dans un deuxième temps, à l'aide d'un modèle bidomaine anisotrope modélisant les milieux intracellulaire et interstitiel et incluant une résistivité modélisant les jonctions gap, nous désirons observer l'évolution des résistivités du myocarde durant l'ischémie dans les orientations longitudinale et transverse ainsi que leur lien avec la fibrillation. Pour ce faire cependant, un système de mesure d'impédance devra être adapté. En effet, un système de mesure permettant de déterminer les résistivités (Le Guyader *et al.*, 2001) dans un

environnement *in vitro* sera modifié afin de le rendre apte à effectuer des mesures dans un environnement *in vivo*. Cela constitue le troisième et dernier objectif de cette étude.

Les mesures proposées dans cette étude, par leur originalité, permettront d'acquérir une meilleure compréhension des nombreux facteurs menant à des troubles du rythme.

CHAPITRE 3

SYSTÈME DE MESURE ET PARTICULARITÉS RELIÉES AUX MESURES *IN VIVO*

Ce chapitre présente le système de mesure utilisé afin de déterminer les différentes résistivités du myocarde. Il présente premièrement le système de mesure original tel que conçu afin d'être utilisé dans un environnement *in vitro* (Le Guyader *et al.,* 2001) et s'attarde ensuite aux particularités reliées aux mesures *in vivo* ainsi qu'aux principaux ajouts qui ont dû être effectuées à ce système afin de le rendre opérable dans un tel environnement.

3.1 SYSTÈME DE MESURE *IN VITRO*

Il est encore impossible de mesurer directement les résistivités du myocarde. On mesure plutôt son impédance et on utilise un modèle électrique du myocarde afin de déterminer les résistivités à partir de l'impédance. Cette première partie du chapitre 3 s'intéressera au système de mesure *in vitro* d'impédance ainsi qu'aux modèles bidomaines, tous deux développés par Le Guyader (Le Guyader *et al.,* 2001).

3.1.1 Mesure de l'impédance

Le système de mesure d'impédance se compose de trois éléments principaux: 1 - une sonde formée de huit électrodes et fixée sur le tissu à l'étude; 2 - un PC 486 muni d'une carte génératrice de fréquence et d'une carte d'acquisition; 3 - un circuit

électronique faisant le pont entre la sonde et les cartes du PC. Regardons chacun des ces éléments plus en détails.

Sonde

La sonde, d'un diamètre de 6,7 mm, est composée de deux séries perpendiculaires de quatre électrodes alignées et équidistantes (Figure 3.1) qui permettent d'effectuer des mesures à la fois dans les directions perpendiculaire et parallèle aux fibres cardiaques sans avoir à déplacer la sonde. Les électrodes sont faites de platine (80%) et d'iridium (20%) et possèdent un diamètre de 50 μm. La distance inter-électrode est ≈340 μm, ce qui est similaire à la constante d'espace du myocarde. Dû à leur très petit diamètre, les électrodes possèdent une impédance très élevée. Avant chaque expérience, leur impédance est donc diminuée en les plaquant pendant une minute avec une solution de noir de platine modifiée (Schwan, 1963) placée dans un bain à ultrason permettant d'augmenter l'adhérence de la couche de noir de platine sur les électrodes (Marrese, 1987). Après chaque plaquage, la sonde est ensuite calibrée à l'aide de solutions salines de conductivités connues afin de déterminer parfaitement le comportement de la sonde.

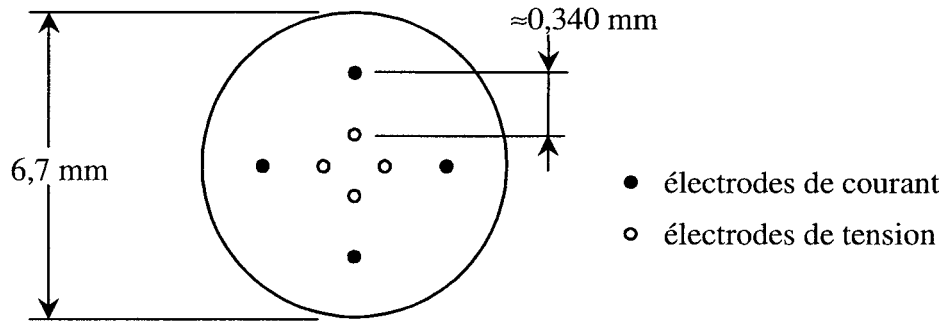


Figure 3.1 Sonde formée de deux séries d'électrodes perpendiculaires.

Circuit électronique et PC

Une carte génératrice de fréquence (PCIP-SST, Keithley, Cleveland OH) insérée dans le PC est utilisée afin de contrôler la source du courant injecté dans le tissu à l'aide de deux électrodes placée aux bouts d'une rangée d'électrodes de la sonde. Un courant alternatif est utilisé plutôt qu'un courant continu. Cette façon de faire comporte l'énorme avantage qu'à la fois les domaines intracellulaire et interstitiel peuvent être échantillonnés en modifiant seulement la fréquence du courant injecté: le courant à basse fréquence circule dans le domaine interstitiel tandis que le courant à haute fréquence peut traverser la membrane cellulaire et circuler à la fois dans le milieu intracellulaire et interstitiel. Cela est dû au fait que la membrane cellulaire se comporte comme un élément capacitif et l'impédance d'un élément capacitif diminue avec l'augmentation de la fréquence du courant qui le traverse. De plus, le courant alternatif injecté est sous-seuil (2,5 μA crête à crête) c'est-à-dire qu'il ne génère pas de potentiel d'action.

Afin de déterminer l'impédance ($Z=V/I$), nous devons disposer, en plus du courant (I), de la différence de potentiel (V) entre deux points. L'échantillonnage du potentiel est fait en utilisant les deux électrodes de tension de la même rangée de quatre électrodes utilisée afin d'injecter le courant. La différence de potentiel est amplifiée à l'aide du circuit d'acquisition et est transférée au PC à l'aide d'une carte d'acquisition (PCIP-SCOPE, Keithley, Cleveland OH) insérée dans ce dernier.

3.1.2 Modèles bidomaines du myocarde

Dû à la structure du myocarde, il est évident qu'en mesurant l'impédance, le résultat que l'on obtient est le fruit de l'interaction de plusieurs éléments tels que la membrane de la cellule, le milieu intracellulaire ainsi que le milieu interstitiel. En utilisant un modèle électrique approprié du myocarde, on est toutefois en mesure d'extraire de la mesure d'impédance brute des caractéristiques telles que les résistivités de ces différents éléments.

Modèle bidomaine anisotrope à courant alternatif

Le modèle est dit bidomaine puisqu'il considère deux domaines distincts, les milieux intracellulaire et interstitiel. Il est également dit anisotrope puisqu'il considère des résistivités distinctes selon deux orientations : longitudinale (parallèle aux fibres cardiaques) et transverse (perpendiculaire aux fibres cardiaques). On peut le schématiser en remplaçant le myocarde par le circuit électrique représenté à la figure 3.2

où: g_e est la conductivité interstitielle du myocarde (S/cm), g_i est la conductivité intracellulaire du myocarde (S/cm), R_m est la résistance transmembranaire spécifique ($\Omega \cdot cm^2$) et C_m est la capacitance membranaire (F/cm^2).

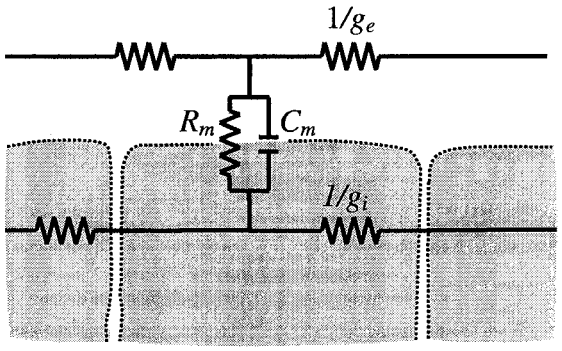


Figure 3.2 Schéma électrique du modèle bidomaine à courant alternatif.

Le modèle bidomaine anisotrope 3D à courant alternatif est régit par les équations suivantes telles que développées par Le Guyader (Le Guyader *et al.*, 2001) :

$$\nabla \cdot (\tilde{g}_i \nabla \phi_i(\omega, r)) = \beta_m Y_m(\omega)(\phi_i(\omega, r) - \phi_e(\omega, r)) \tag{3.1}$$

$$\nabla \cdot (\tilde{g}_e \nabla \phi_e(\omega, r)) = -\beta_m Y_m(\omega)(\phi_i(\omega, r) - \phi_e(\omega, r)) - I_o \sin(\omega)\delta(r_o) \tag{3.2}$$

qui mettent en jeu les paramètres suivants :

$\tilde{g}_i$ tenseur des conductivités intracellulaires du myocarde (S/cm)

$$\tilde{g}_i = \begin{pmatrix} g_{iL} & 0 & 0 \\ 0 & g_{iT} & 0 \\ 0 & 0 & g_{iT} \end{pmatrix}$$

où g_{iL} représente la conductivité intracellulaire longitudinale (=$1/r_{iL}$ où

r_{iL} est la résistivité intracellulaire longitudinale)

g_{iT} représente la conductivité intracellulaire transverse (=$1/r_{iT}$ où r_{iT} est la résistivité intracellulaire transverse)

$\tilde{g}_e$ tenseur des conductivités interstitielles du myocarde (S/cm)

$$\tilde{g}_e = \begin{pmatrix} g_{eL} & 0 & 0 \\ 0 & g_{eT} & 0 \\ 0 & 0 & g_{eT} \end{pmatrix}$$

où g_{eL} représente la conductivité interstitielle longitudinale (=$1/r_{eL}$ où r_{eL} est la résistivité interstitielle longitudinale)

g_{eT} représente la conductivité interstitielle transverse (=$1/r_{eT}$ où r_{eT} est la résistivité interstitielle transverse)

ϕ_i, ϕ_e distributions des potentiels intracellulaires et interstitiels dans le milieu (V)

ω fréquence angulaire (rad)

r coordonnés $r = (x,y,z)$

β_m rapport de l'aire d'une cellule du myocarde et de son volume (cm^{-1})

Y_m admittance spécifique de la membrane cellulaire ($\Omega^{-1} \cdot cm^{-2}$)

$$Y_m = 1/R_m + j\omega C_m = 1/Z_m$$

où Z_m est l'impédance membranaire spécifique ($\Omega \cdot cm^2$)

I_o amplitude de la source de courant (A/cm^3)

δ fonction delta de Dirac

r_o coordonnées du site d'injection du courant $r_o = (x_o,y_o,z_o)$

Il est possible de transformer les équations 3.1 et 3.2 à l'aide de la transformée de Fourier spatiale afin d'isoler le potentiel extracellulaire (Le Guyader *et al.*, 2001):

$$\phi_e(\omega, r) = \Im_{k_r}^{-1}\left\{\frac{\hat{I}_s(\omega, k_r)\cdot(S_i - \beta_m Y_m(\omega))}{S_e(\beta_m Y_m(\omega) - S_i) + S_i\beta_m Y_m(\omega)}\right\} \tag{3.3}$$

où: $\Im_{k_r}^{-1}$ est la transformée de Fourier spatiale inverse

$$\hat{I}_s(\omega, k_r) = \Im_r\{I_s(\omega, r_o)\}$$

où $\Im_r$ est la transfomée de Fourier spatiale

$$I_s(\omega, r_o) = I_o \sin(\omega)\delta(r_o)$$

$$S_i = -(g_{ix}k_x^2 + g_{iy}k_y^2 + g_{iz}k_z^2)$$

$$S_e = -(g_{ex}k_x^2 + g_{ey}k_y^2 + g_{ez}k_z^2)$$

où g_{ix}, g_{iy}, g_{iz} représentent les conductivités intracellulaires selon les axes **x**, **y** et **z**

g_{ex}, g_{ey}, g_{ez} représentent les conductivités interstitielles selon les axes **x**, **y** et **z**

k_x, k_y, k_z représentent les fréquences spatiales selon les axes **x**, **y** et **z**

Il est alors facile de déterminer les impédances longitudinales ($Z_L^S(\omega)$) et transverses ($Z_T^S(\omega)$) simulées en fixant les différents paramètres du modèle et on a:

$$Z_L^S(\omega) = \frac{\phi_e(\omega, r_{L1}) - \phi_e(\omega, r_{L2})}{I_S(\omega, r_{oL})} \tag{3.4}$$

$$Z_T^S(\omega) = \frac{\phi_e(\omega, r_{T1}) - \phi_e(\omega, r_{T2})}{I_S(\omega, r_{oT})} \tag{3.5}$$

où : r_{L1}, r_{L2} sont les sites des électrodes de mesure de potentiel dans la direction longitudinale

r_{T1}, r_{T2} sont les sites des électrodes de mesure de potentiel dans la direction transverse

r_{oL}, r_{oT} sont les sites d'injection du courant dans les directions longitudinale et transverse

Modèle bidomaine anisotrope à courant alternatif incluant une capacité spécifique intracellulaire

Certaines études démontrent l'existence d'une capacité intracellulaire en plus de la résistivité intracellulaire ($1/g_i$) (Chapman et Fry, 1978; Sperelakis et Hoshiko, 1961). Afin d'introduire ce caractère capacitif au milieu intracellulaire, il est possible de modifier la résistivité intracellulaire et de la remplacer par une résistivité cytoplasmique, R_c (Ω·cm), en série avec une impédance de jonction, Z_j (Ω·cm), elle-même composée d'une résistivité modélisant les jonctions gap, R_{gap} (Ω·cm), et d'une capacité spécifique des disques intercalaires, C_{sd} (F/cm). Selon la direction longitudinale, nous avons donc l'impédance intracellulaire spécifique suivante:

$$Z_{iL} = R_c + Z_j \tag{3.6}$$

où

$$1/Z_j = 1/R_{gap} + j\omega C_{sd} \tag{3.7}$$

Pour ce qui est de la direction transverse, il est cependant nécessaire d'introduire un autre paramètre: *N*, qui est le rapport entre la densité de jonction transverse et longitudinale. L'impédance spécifique intracellulaire transverse est donc:

$$Z_{iT} = R_c + N \cdot Z_j \tag{3.8}$$

En tenant compte de la fraction du volume intracellulaire, ξ_i, nous avons les conductivités intracellulaires longitudinales et transverses suivantes : $g_{iL}(\omega) = \xi_i / Z_{iL}$ et $g_{iT}(\omega) = \xi_i / Z_{iT}$. De même, nous avons $g_c = \xi_i / R_c = 1/r_c$, $g_{gap} = \xi_i / R_{gap} = 1/r_{gap}$ et $c_d = \xi_i C_{sd}$. On peut alors schématiser le modèle tel qu'à la figure 3.3. Le calcul de l'impédance simulée s'effectue de la même façon qu'avec le modèle précédent (équations 3.4 et 3.5).

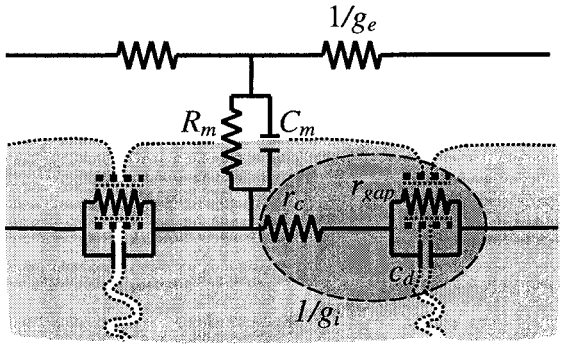


Figure 3.3 Schéma électrique du modèle bidomaine à courant alternatif incluant une capacité spécifique intracellulaire

3.1.3 Détermination des résistivités à partir de l'impédance

Les paramètres du modèle bidomaine sont optimisés afin de minimiser la différence entre les impédances expérimentales mesurées à l'aide de la technique à quatre électrodes et celles obtenues en simulation à l'aide du modèle selon, à la fois, les directions longitudinale et transverse et les différentes fréquences utilisées:

$$\varepsilon = \sqrt{\sum_i \left[\left| Z_L^S(\omega_i) - Z_L^E(\omega_i) \right|^2 + \left| Z_T^S(\omega_i) - Z_T^E(\omega_i) \right|^2 \right]} \qquad (3.9)$$

où $Z_L^E(\omega)$ et $Z_T^E(\omega)$ sont les mesures d'impédance expérimentales selon la direction longitudinale et tranverse respectivement pour une fréquence donnée.

Le logiciel d'optimisation SolvOpt (Kuntsevich et Kapper, 1997), qui est basé sur l'algorithme *r* de Shor, est utilisé afin de déterminer les paramètres bidomaines minimisant ε. Ce logiciel ne peut cependant gérer un grand nombre de paramètres à la fois. Or, le modèle bidomaine anisotrope à courant alternatif incluant une capacité spécifique intracellulaire comporte huit paramètres non déterminés (g_c, c_d, g_{gap}, g_{eL}, g_{eT}, β_m, R_m, N), C_m étant fixée à 1 μF/cm^2 (Chapman et Fry, 1978). Ce nombre de paramètres dépasse les capacités du logiciel. Afin de contourner ce problème, l'optimisation s'effectue en deux temps. Dans un premier temps, les paramètres du modèle bidomaine anisotrope à courant alternatif (g_{iL}, g_{iT}, g_{eL}, g_{eT}, β_m, R_m) sont optimisés en utilisant les impédances obtenues lors de l'application de courant à basses fréquences (par exemple $\omega_i/(2\pi)$ = [10,...,2400] (Hz)). Dans un deuxième temps, les conductivités extracellulaires (g_{eL}, g_{eT}) obtenues du premier modèle sont incorporées dans le modèle

bidomaine anisotrope à courant alternatif incluant une capacité spécifique intracellulaire et les six paramètres restants (g_c, c_d, g_{gap}, β_m, R_m, N) sont optimisés en utilisant simultanément des mesures prises dans une large bande de fréquences (typiquement $\omega_i/(2\pi)$ = [10,...,10 000] (Hz)). Les paramètres minimisants ε sont choisis comme étant les paramètres optimaux du modèle et, par extension, ceux du tissu.

3.2 PARTICULARITÉS RELIÉES AUX MESURES *IN VIVO* ET AJOUTS APPORTÉS AU SYSTÈME DE MESURE

Plusieurs particularités surviennent lorsque l'on désire effectuer des mesures dans un environnement *in vivo* plutôt qu'*in vitro* de sorte que l'on ne peut utiliser le système décrit précédemment sans effectuer quelques ajouts.

Premièrement, contrairement à un laboratoire, l'environnement dans une salle d'opération est difficilement contrôlable. En effet, un certain nombre d'appareils sont nécessaires au maintien du sujet en vie et à son monitoring. Ces appareils peuvent être la source de bruits électromagnétiques. Deuxièmement, un cœur *in vivo*, contrairement à un morceau de tissu cardiaque, est en constant mouvement, il bat. On doit donc être en mesure de bien fixer la sonde sur le cœur tout en l'orientant dans la direction désirée. Finalement, il a été démontré que l'impédance du myocarde varie en fonction du cycle cardiaque (Steendijk *et al.,* 1994; Steendijk *et al.,* 1993). On doit donc effectuer toutes les mesures au même instant par rapport au début du cycle afin d'obtenir des mesures rigoureuses. Voyons ces aspects de plus près.

3.2.1 Élimination des sources de bruit

Le fait de se trouver dans une salle d'opération plutôt que dans un laboratoire engendre certaines contraintes. En effet, dans un laboratoire, il est facile de contrôler certains éléments indésirables tels que le bruit électromagnétique. De fait, le système *in vitro* original était entouré d'une cage de Faraday afin de limiter l'impact de telles sources de bruit. Il est évidemment impensable, lors de mesures *in vivo*, de placer le patient dans une cage de Faraday! Afin de résoudre les problèmes de bruits rencontrés et dans le but d'éviter de concevoir un nouveau système de mesure, nous avons tout simplement identifié et éliminé les sources de bruit.

La principale cause de bruit identifiée est le polygraphe (Nihon-Kohden, Polygraph System RM-6000, Tokyo, Japon) qui, par l'entremise de ses branchements sur le sujet, injecte une quantité de courant venant perturber les mesures effectuées. Le polygraphe fut donc éliminé et remplacé par un holter (Altair-DISC, Spacelabs Medical, Redmond WA) qui a l'avantage d'être isolé puisqu'il possède sa propre alimentation à piles. La seconde cause de bruit identifiée est l'écran de l'ordinateur du système d'acquisition. En effet, les aimants présents dans cet appareil sont suffisants pour bruiter les mesures. Il fut donc nécessaire de l'éloigner le plus possible du site de mesure et du circuit d'acquisition. La maîtrise de ces deux sources de bruit fut suffisante afin d'obtenir des signaux relativement non bruités.

3.2.2 Fixation de la sonde

Une seconde particularité concernant les mesures *in vivo* est le mouvement occasionné par le battement du cœur. En effet, lors de mesures *in vitro*, le tissu est fixe et la sonde peut être simplement déposée sur le tissu. Lors de mesures *in vivo*, cependant, le cœur est en mouvement et l'expérimentateur doit s'assurer que la sonde est stable et ne dérive pas. Deux techniques ont été utilisées afin de fixer la sonde sur un cœur en mouvement: la colle cyanoacrylate et la suture. Dans les deux cas, ce n'est pas la sonde qui fut fixée au tissu mais plutôt un support cylindrique fait de *Silastic*^{mc} (Dow Corning, Midland MI) (diamètre intérieur: 6,35 mm; diamètre extérieur: 9,53 mm; hauteur ≈5 mm) dans lequel fut insérée la sonde (Figure 3.4).

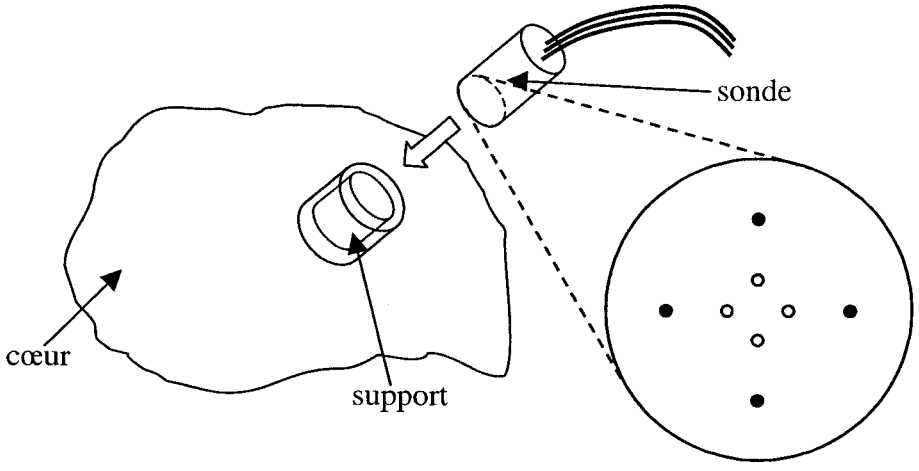


Figure 3.4 Fixation de la sonde sur le cœur à l'aide d'un support.

Colle cyanoacrylate

La colle qui a été utilisée est une colle de cyanoacrylate, mieux connue sous sa marque de commerce *Crazy Glue*[mc]. Le support a été fixé sur le cœur en déposant la colle sur la circonférence de ce dernier et en prenant bien soin d'assécher la portion d'intérêt du cœur au préalable. Plusieurs problèmes se sont présentés lors de l'utilisation de cette technique. Premièrement, lors de l'application de la colle, cette dernière a coulé sur le site de mesure à maintes reprises et a dû être enlevée, ce qui a eu pour effet d'irriter le tissu. De plus, une certaine quantité de colle s'est retrouvée sur les électrodes à une reprise ce qui a mis un terme à l'expérience. Finalement, cette technique n'a pas permis d'obtenir une fixation suffisamment solide, en effet, la sonde s'est décollée à quelques reprises. Nous nous sommes donc tournés vers une autre approche.

Suture

La technique qui a plutôt été utilisée est celle de la suture. Le support de la sonde, au lieu d'être collé, est en effet suturé sur le cœur à l'aide de trois points de suture équidistants sur la circonférence du support. Cette technique a éliminé complètement les problèmes occasionnés par la colle et s'est avérée très efficace afin de maintenir la sonde en place. Le seul problème est peut être le fait que la pratique des points de suture engendre des saignements qui coulent sur le site de mesure. Afin de contrer ce problème, le site est asséché à l'aide d'un coton-tige avant l'insertion de la sonde dans le support afin de minimiser l'impact d'une couche de liquide entre les électrodes et le tissu (Steendijk *et al.,* 1993).

3.2.3 Orientation de la sonde

L'orientation des fibres cardiaques et la présence des jonctions gap donne lieu à une anisotropie dans la conduction électrique du myocarde. La sonde doit donc être orientée de façon à ce qu'une rangée d'électrodes soit parallèle et l'autre perpendiculaire aux fibres cardiaques afin de bien mesurer l'impédance selon les orientations longitudinale et transverse. Lors d'une situation *in vitro*, cela est particulièrement facile à effectuer en utilisant un microscope optique. Cependant, dû au mouvement du cœur en situation *in vivo*, l'utilisation d'une telle technique est impensable. De plus, en utilisant un microscope optique on est contraint à placer la sonde à un endroit facile d'accès pour le microscope. Afin de remédier à ces problèmes, deux approches furent développées: la première est l'utilisation du fait que la distribution de potentiel suite à une injection de courant dans le myocarde est symétrique (Plourde *et al.,* 2000) et la seconde est l'utilisation des vitesses de conduction comme indice de l'orientation des fibres cardiaques.

Distribution symétrique du potentiel

Lorsque l'on injecte un courant en un point dans le myocarde, cela génère une distribution de potentiel de forme ellipsoïdale autour des électrodes de source et de puits de courant. La figure 3.5 montre une simulation de la distribution de potentiel effectuée à l'aide du modèle décrit à la section 3.1.2. Lorsque le courant est injecté de façon perpendiculaire (Figure 3.5A) ou parallèle (Figure 3.5B) aux fibres cardiaques, il apparaît une ligne droite de potentiel nul. Dans les autres cas, on voit plutôt apparaître

une ligne courbe de potentiel nul (Figure 3.5C). Afin de déterminer si l'on est en présence d'une ligne ou d'une courbe de potentiel nul et donc de déterminer l'orientation de la sonde, il suffit de mesurer la différence de potentiel sur les électrodes de potentiel perpendiculaires aux électrodes utilisées afin d'injecter le courant, si cette mesure est nulle, on est en présence d'une ligne de potentiel nul.

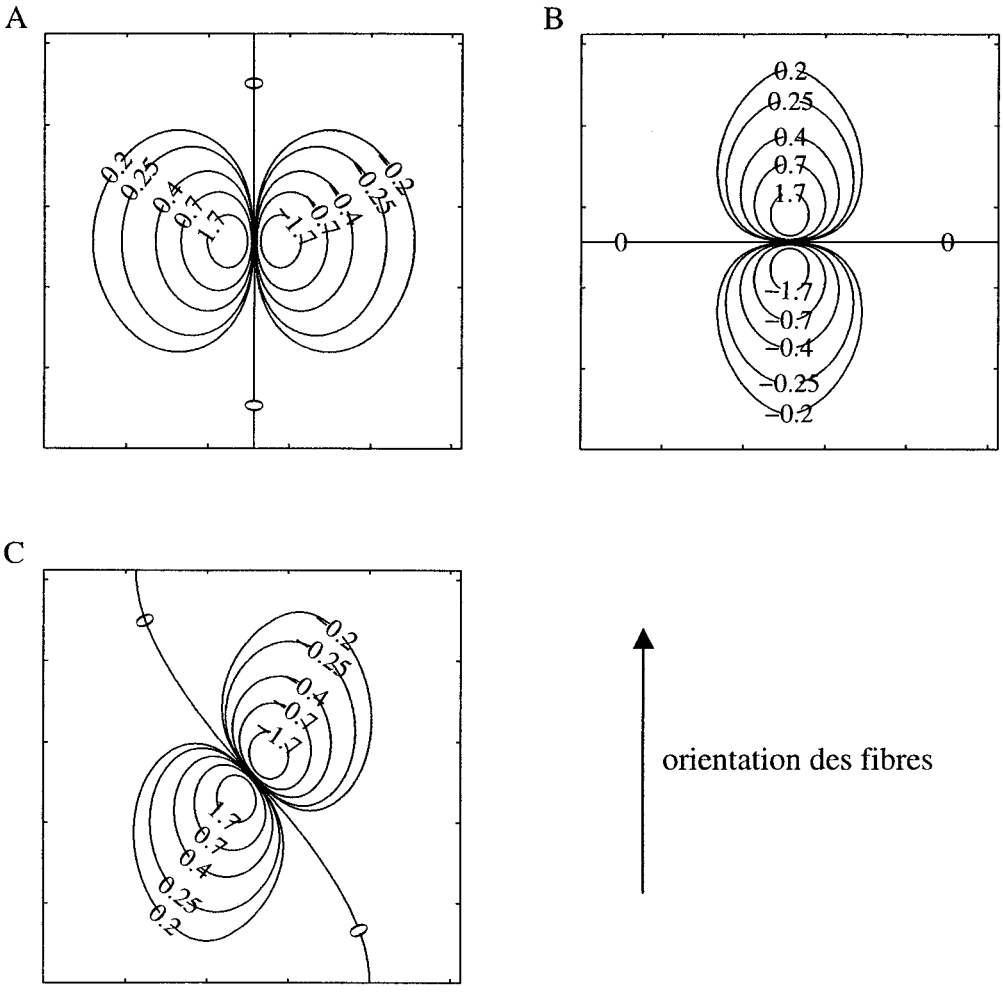


Figure 3.5 Distribution du potentiel $\phi_e(\omega,r)$ (mV) sur le myocarde selon différentes orientations d'injection de courant par rapport aux fibres.

Cependant, l'alignement d'une rangée d'électrodes de façon perpendiculaire et parallèle aux fibres cardiaques résultent tous les deux en une ligne de potentiel nul. Afin de différencier entre ces deux cas, il suffit d'observer la différence de potentiel des électrodes parallèles à l'injection de courant et, contrairement à ce qu'on pourrait penser de façon intuitive, cette dernière est supérieure lorsque l'injection du courant s'effectue selon le sens des fibres. En effet, puisque le modèle bidomaine anisotrope utilisé dans cette étude ne se résout pas de façon analytique, considérons un modèle monodomaine anisotrope. Tel que démontré par plusieurs auteurs (Gulrajani, 1998; Plonsey, 1969), les conductivités longitudinale et transverse d'un tel modèle s'expriment de la façon suivante :

$$g_T = \frac{I}{2\pi d V_L} \tag{3.10}$$

$$g_L = \left[\frac{V_L}{V_T}\right]^2 g_T \tag{3.11}$$

où g_L et g_T sont respectivement les conductivités selon les orientations longitudinale et transverse, V_L et V_T sont les différences de potentiel mesurées selon les orientations longitudinale et transverse et d est la distance inter-électrode. Puisque la conductivité dans le sens des fibres (g_L) est supérieure à celle perpendiculaire aux fibres (g_T) (Plonsey, 1969), il est évident, d'après 3.11, que la différence de potentiel selon le sens des fibres (V_L) doit être supérieure à celle perpendiculaire au sens des fibres (V_T).

La figure 3.6 montre le résultat d'une simulation de la rotation de la sonde sur le tissu à l'aide du modèle bidomaine. On y présente les potentiels obtenus en effectuant des mesures sur les électrodes perpendiculaires et parallèles à l'injection du courant en fonction de l'angle de rotation de la sonde par rapport à l'orientation des fibres cardiaques; 0^{o} étant une injection et donc un alignement parallèle aux fibres.

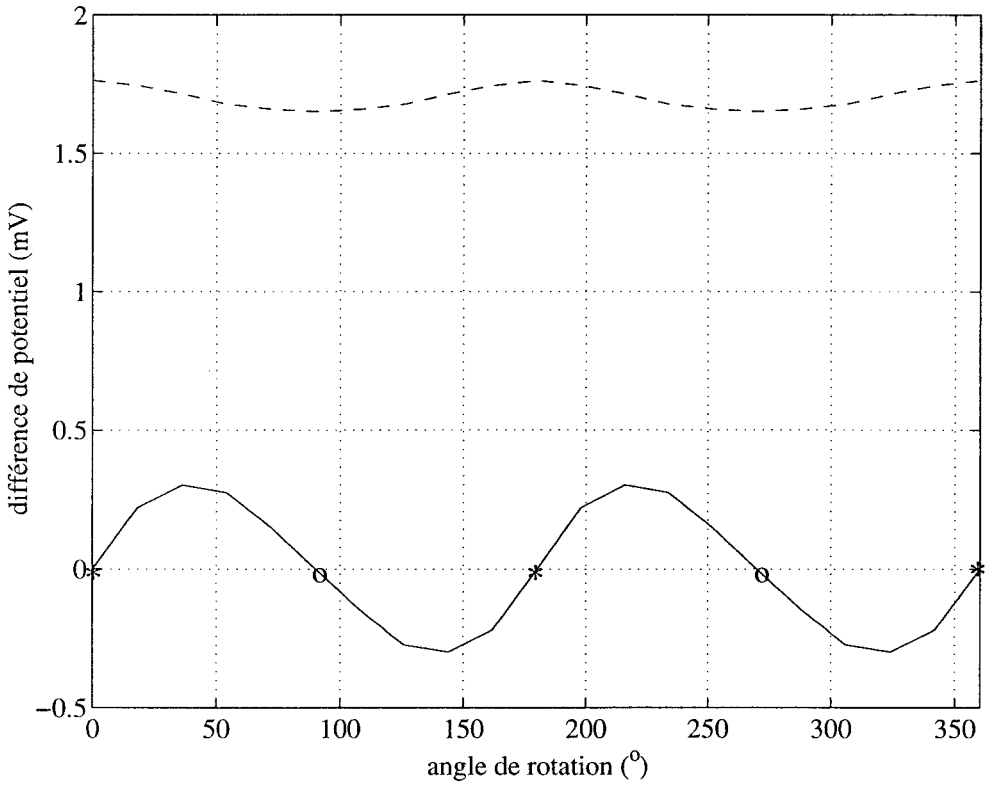


Figure 3.6 Différences de potentiel mesurées à l'aide des électrodes perpendiculaires (—) et parallèles (---) à l'injection du courant en fonction de l'angle de rotation de la sonde par rapport aux fibres cardiaques (* orientation de la sonde parallèle aux fibres; o orientation de la sonde perpendiculaire aux fibres).

Cette figure démontre le passage par des zéros du potentiel mesuré par les électrodes de potentiel perpendiculaires à l'injection du courant (—). Elle démontre également, à l'aide de la lecture sur les électrodes parallèles à l'injection du courant (--), la possibilité de différencier entre les zéros causés par l'alignement parallèle ou perpendiculaire aux fibres; le potentiel mesuré par ces électrodes étant clairement supérieur dans la direction parallèle aux fibres (0^{o}, 180^{o}, 360^{o}) par rapport à la direction perpendiculaire aux fibres (90^{o}, 270^{o}).

En résumé, il suffirait donc de placer la sonde sur le tissu et d'effectuer sa rotation tout en injectant un courant. Une mesure de potentiel nulle sur les électrodes perpendiculaires signifierait alors l'alignement perpendiculaire ou parallèle aux fibres. Afin de différencier entre ces deux cas, il s'agirait alors, lorsque l'on a identifié une ligne de potentiel nul, de mesurer le potentiel des électrodes parallèles à l'injection du courant, d'effectuer une rotation de la sonde de 90^{o}, d'injecter un courant et de reprendre une mesure sur les électrodes parallèles à l'injection du courant: la direction parallèle aux fibres est la direction de la plus grande de ces deux dernières mesures.

Cette technique, bien qu'elle semble attrayante a dû être mise de côté. En effet, deux problèmes majeurs sont survenus lors d'essais expérimentaux. Le premier est la difficulté à effectuer une rotation de la sonde efficace avec le système de fixation retenu et le second est la possibilité que la rotation de la sonde ne vienne effriter le plaquage

effectué sur la sonde et donc modifier le comportement de cette dernière lors de la lecture de l'impédance.

Vitesses de conduction

Une autre technique fut donc développée soit l'utilisation des vitesses de conduction comme indice de l'orientation des fibres cardiaques.

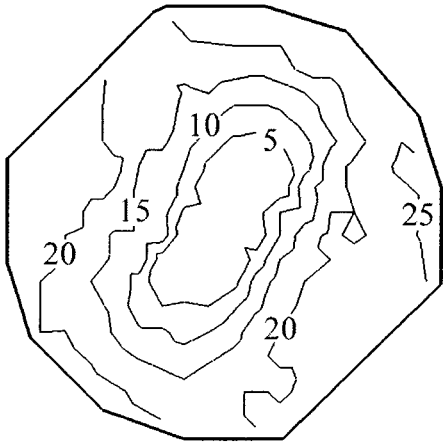


Figure 3.7 Carte des temps de conduction (ms).

Pour mesurer les vitesses de conduction, une plaque hexagonale de 5,4 cm de diamètre comprenant 192 électrodes unipolaires est suturée sur le cœur au site de mesure. En stimulant au centre de la plaque et en mesurant simultanément les potentiels sur la plaque pendant un certain temps après la stimulation, il est possible, à l'aide d'un logiciel de mapping cardiaque (CardioMap III, Institut de génie biomédical, Montréal) de tracer les cartes de conduction (Figure 3.7). Étant donné les vitesses de conduction

supérieures selon l'orientation longitudinale, c'est-à-dire parallèle aux fibres (Plonsey, 1969), il est facile de distinguer l'orientation des fibres et de placer une rangée d'électrode de la sonde selon cette orientation. Cette technique beaucoup plus simple que la précédente fut donc adoptée.

3.2.4 Variations de l'impédance durant un cycle cardiaque

Certaines modifications ont également dû être apportées concernant le moment où l'acquisition des données est effectuée. En effet, selon certains auteurs, les mesures d'impédance subissent une variation d'environ 7% durant le cycle cardiaque (Steendijk *et al.,* 1994; Steendijk *et al.,* 1993). Afin d'obtenir les mesures les plus justes possibles, il est nécessaire de limiter l'effet d'une telle variation sur les mesures en effectuant une synchronisation entre les mesures et le cycle cardiaque. Pour ce faire, le cœur fut entraîné à l'aide d'un stimulateur cardiaque (Bionova PCS-80, Institut de génie biomédical, Montréal QC; Grass Medical Instruments, S8 Stimulator, Quincy MA) à une fréquence constante variant entre 141 et 150 cycles/sec selon le sujet. Le signal du stimulateur cardiaque fut capté par le port parallèle du PC d'acquisition et utilisé par le programme d'acquisition afin de déclencher le début de chaque enregistrement à 375 ms du début de la stimulation, c'est-à-dire du début du cycle cardiaque. Cela a donc eu pour effet d'éliminer des mesures les variations dues au cycle cardiaque.

Ce chapitre a présenté le système de mesure tel qu'opérable dans un environnement *in vivo.* Il a été question du système de mesure *in vitro* et des

modifications qui ont dû lui être apportées afin de le rendre opérable *in vivo*. Le chapitre suivant présentera une application de ce système soit la détermination des résistivités lors de l'ischémie dans le but de mieux comprendre le découplage cellulaire.

CHAPITRE 4

DÉCOUPLAGE CELLULAIRE DURANT L'ISCHÉMIE AIGUE : MESURES D'IMPÉDANCE APPUYÉES PAR L'UTILISATION D'UN MODÈLE BIODMAINE INCLUANT UNE CAPACITANCE INTRACELLULAIRE

4.1 SITUATION DE L'ARTICLE DANS LE MÉMOIRE

Le découplage cellulaire provoqué par l'ischémie aiguë pourrait être relié à la fibrillation. Bien qu'il ait été étudié *in vitro* à l'aide de la technique de double patch clamp (Daleau, 1998; Weingart, 1986; Kameyama, 1983), peu d'études *in vivo* existent concernant ce phénomène.

Le système de mesure d'impédance décrit précédemment permet d'effectuer ce genre d'étude. En effet, l'utilisation du modèle bidomaine incluant une capacité spécifique intracellulaire permet d'observer les modifications des jonctions gap lors de l'ischémie aiguë et donc d'étudier le découplage cellulaire *in vivo*. De plus, certains éléments nous permettent de croire que la phase de l'impédance pourrait également être utilisée à cette fin (Cinca *et al.*, 1997).

Ces deux approches seront donc mises à profit afin de tenter de repousser plus loin les connaissances concernant, entre autres, le lien entre le découplage cellulaire et la fibrillation.

(Manuscrit soumis à *Circulation*)

CELLULAR UNCOUPLING DURING ACUTE ISCHEMIA: ANALYSIS OF IMPEDANCE MEASUREMENTS WITH AN ANISOTROPIC BIDOMAIN MODEL INCLUDING GAP JUNCTIONS

Eric Plourde[1,2], Pierre Savard PhD[1,2], Pierre Le Guyader PhD[3], Pascal Daleau PhD[4], René Cardinal PhD[2]

[1]Institut de génie biomédical, [2]Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, [3]Institut de cardiologie de Montréal, and [4]Institut de cardiologie de Québec,

Correspondence:

Pierre Savard PhD
École Polytechnique
CP 6079 succursale centre-ville
Montréal (Québec) Canada
H3T 3A7

Telephone : (514) 340-4711 ext. 4186
Fax : (514) 340-4611
Email : savard@igb.polymtl.ca

This work has been supported, in part, by the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Heart and Stroke Foundation.

4.2 ABSTRACT

BACKGROUND: To investigate the passive electrical properties of the myocardium, suspected to play a major role in cardiac arrhythmias, we have recently developed an innovative instrument that allows their *in vivo* measurement. METHOD AND RESULTS: Experiments were performed in 13 anesthetized pigs subjected to a 3-hour acute occlusion of the LAD. Tissue impedance (amplitude and phase angle) was measured over the ischemic area using the four-electrode technique with alternating current (12 Hz – 10 kHz). Because of the small inter-electrode distance (350 μm), current flowed extracellularly at low frequencies whereas it was shunted into the intracellular domain through the membrane capacitance at high frequencies. Impedance values (measured parallel and perpendicular to the fibers) were optimally fitted with an anisotropic bidomain model to estimate the electrical resistivities of the extracellular and intracellular domains (including gap junction resistivity and intercalated disk specific capacitance). Prior to the occlusion, impedance values were stable and computed bidomain conductivities were in the physiological range. After occlusion, the impedance amplitude increased as expected, but the high frequency impedance phase angle (10 kHz) showed a most striking change: a sudden phase lag (+5 degrees) that was soon followed by fibrillation. During this phase lag, the bidomain model showed a drastic increase in the resistivity of the gap junctions (1.3±0.2 to 559±195 kΩ·cm) suggesting cellular uncoupling. CONCLUSION: Our approach permits the observation

of cellular uncoupling in a way never seen before by discriminating the time course of the interstitial, cytoplasmic and gap junction resistivities during ischemia.

4.3 CONDENSED ABSTRACT

The passive electrical properties of the myocardium in pigs subjected to acute coronary artery occlusion were investigated with innovative impedance measurements. Impedance values at different frequencies were optimally fitted with an anisotropic bidomain model to estimate the electrical resistivities of the interstitial and intracellular domains. Cellular uncoupling was identified by a drastic decrease in the impedance phase angle and an increase in the gap junction resistivity, this was soon followed by ventricular fibrillation. The model gives new insight in cellular uncoupling during acute ischemia.

Key Words: reentry, conduction, ischemia, electrophysiology, fibrillation

4.4 INTRODUCTION

Cell-to-cell electrical uncoupling is thought to occur early and to contribute to acute arrhythmia generation after coronary artery occlusion (Smith *et al.,* 1995). The direct measurement of electrical cell-to-cell coupling through gap junctions has been performed *in vitro* using the double voltage-clamp technique (Daleau, 1998; Weingart, 1986; Kameyama, 1983). This technique is however inappropriate for *in situ* assessment of cell-to-cell coupling because it uses intracellular electrodes. Extracellular electrodes have been used in some *in situ* studies to estimate tissue impedance as the ratio of the voltage over the injected current. Increased impedance amplitude measured in this fashion has been interpreted as an indirect marker of cellular uncoupling (Schwartzman *et al.,* 1999; Cinca *et al.,* 1997; Smith *et al.,* 1995).

Such tissue impedance measurements take into account both the interstitial and intracellular resistivities and, therefore, they are not specifically related to gap junction resistance that determines cell-to-cell coupling. In principle, additional information would be available from measurements of the phase angle (delay) between the sinusoidal current injected at a certain frequency and the induced voltage waveform. Phase angle variations have been shown to follow a time course similar to one displayed by impedance amplitude changes after coronary artery occlusion (Fallert *et al.,* 1993). Moreover, it has been proposed that it might be a better indicator of cell-to-cell uncoupling than impedance amplitude under the rationale that gap junction impairment would divert the intracellular currents flowing between neighboring cells from gap

junctional resistive pathways to the capacitive pathways of the intercalated disks (Cinca *et al.*, 1997).

To better understand the significance of electrical impedance changes (amplitude and phase angle) observed during ischemia, we subjected impedance measurements to quantitative analysis using a theoretical electrical model of the myocardium that we have previously developed (Le Guyader *et al.*, 2001). The parameters of this modified bidomain model that specifically includes gap junction resistance and intercalated disk capacitance, were estimated by fitting the model to the impedance measurements. Additional innovations were *1)* the use of a probe consisting of an 8-electrode array with an interelectrode distance (340 μm) similar to the myocardial space constant, and *2)* the use of sinusoidal current injection at multiple frequencies (12Hz-10,000Hz) under the rationale that low frequency currents flow through the interstitial domain whereas high frequency currents are shunted in the intracellular domain via the sarcolemmal capacitance.

4.5 METHODS

4.5.1 Experimental preparation

Measurements were obtained *in vivo* from 13 Landrace pigs weighting between 20 and 26 kg. The animals were anesthetized (ketamine, 20 mg/kg and xylazine, 2 mg/kg) through an endotracheal tube and maintained with 2-2.5% isoflurane. A midsternotomy was performed and the left anterior descending coronary artery (LAD)

was dissected free from the myocardium 2-3 cm from its origin, a snare was introduced around it to perform reversible occlusions. A heating plate was used to maintain normal body temperature.

Subepicardial fiber orientation in the anterior left ventricular wall was determined from isochronal maps generated with a PC-based multi-channel recording system (Cardiomap, Institut de génie biomédical, Montréal) while stimulating from the center of a plaque electrode array carrying 192 unipolar recording contacts (2.6 mm spacing). Activation times measured with reference to the earliest activation in the center of the electrode array displayed an elliptical isochronal pattern in which the direction of rapid conduction was assumed to indicate the longitudinal orientation of subepicardial myocardial fibers. The ischemic region was then identified by performing a brief LAD occlusion. The plaque electrode was then removed and a short Silastic anchoring tube was sutured in the center of the ischemic region. The impedance probe was inserted into the tube and oriented along the longitudinal and transverse fiber directions. Care was taken to dry the heart surface in order to minimize the effects of a fluid layer between the electrodes and the tissue (Steendijk *et al.,* 1993). Impedance measurements were made every 3 min over a 30 min period prior to LAD occlusion (control). Measurements were repeated every 90 sec for the first 45 min following occlusion and every 3 min for an additional 135 min period.

Atrial pacing was performed just above sinus rate (141-150/min) throughout the experiment. Impedance measurements were synchronized with the stimulator used for

pacing so that measurements were restricted to the diastolic interval to avoid impedance variations during the cardiac cycle (Steendijk *et al.,* 1993). Unipolar electrograms were continuously monitored from two sites in ischemic and healthy areas. Whenever ventricular fibrillation occurred, defibrillation shocks (20-30 Joules) were promptly applied to the heart (without reperfusing). Impedance measurements were not made during defibrillation. Animal care was done in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and monitored by the Animal Care Commity of the Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal.

4.5.2 Myocardial Impedance and resistivities measurements

The impedance measurement system and anisotropic bidomain model used in this study have been reported in detail previously (Le Guyader *et al.,* 2001) and will therefore be briefly presented here.

Impedance measurement

Impedance was measured using the 4-electrode technique (Plonsey and Barr, 1982; van Oosterom *et al.,* 1979) in which current is injected between the 2 outermost electrodes of 4 equidistant and aligned electrodes, whereas voltage is measured between the 2 innermost electrodes. In order to account for tissue anisotropy, the impedance probe consisted of 2 perpendicular rows of 4 electrodes, one row being aligned along the longitudinal fiber direction (estimated as the direction of rapid conduction velocity) and the other one being aligned along the transverse fiber direction (relatively slower

conduction velocity). Each electrode was made of platinum (80%) and iridium (20%) and had a diameter of 50 μm. The inter-electrode distance was of 340 μm, which is similar to the myocardial space constant. The impedance of the electrodes was lowered by plating them just before each experiment, using a modified platinum-black solution placed in an ultrasound bath to increase adherence (Marrese, 1987). The probe was then calibrated using 3 saline solutions of known conductivity.

Alternating current was used so that both intracellular and interstitial domains could be sampled by varying its frequency, low frequency currents flowing through the interstitial domain and high frequency currents being shunted in the intracellular domain through the membrane capacitance. Sub-threshold current (2.5 μA) was generated by a PC-controlled frequency generator (PCIP-SST, Keithley, Cleveland OH) at 10 different frequencies (12 Hz to 10 kHz). Voltage was measured with a custom-designed amplifier and sampled with a data acquisition PC-card (PCIP-SCOPE, Keithley, Cleveland OH). Impedance measurements at all frequencies required a total of 85 seconds.

Anisotropic bidomain model

In order to estimate the values of myocardial resistivities from impedance measurements, an electrical model of the myocardium is necessary (Figure 4.1). We used a bidomain model with unconstrained anisotropy taking into account the interstitial and intracellular domains as well as the cellular membrane which separates them. The interstitial domain is purely resistive and is modeled by a resistivity component ($r_e=1/g_e$)

whereas the cellular membrane is modeled by a specific resistance (R_m) in parallel with a specific capacitance (C_m) which accounts for the double layer of lipids constituting the cell membrane. The intracellular domain is modeled by three components: a resistivity accounting for the cytoplasm ($r_c=1/g_c$), a resistivity representing the gap junction ($r_{gap}=1/g_{gap}$) and a specific capacitance of the intercalated disk (c_d) due to the proximity and interdigitation of the membranes at the end of the myocytes. To account for electrical anisotropy, gap junction resistivity in the transverse orientation is multiplied by a factor N, which is the transverse to longitudinal ratio of junction density, whereas intercalated disk capacitance is divided by a factor N. Another parameter, β, the surface to volume ratio of a myocyte, is also used in the model.

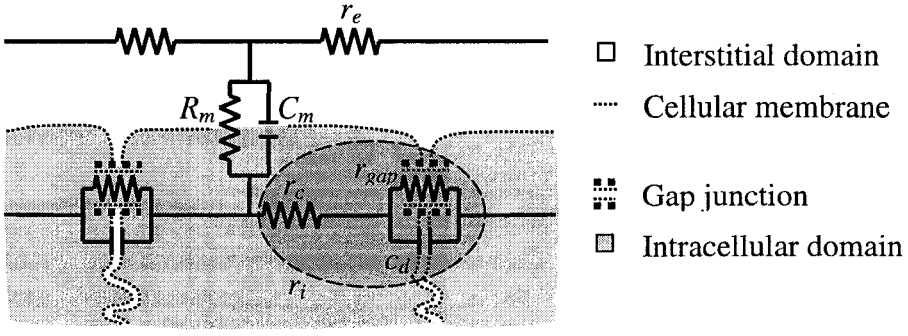


Figure 4.1 Bidomain model for the longitudinal direction (r_e : interstitial resistivity; r_i: intracellular resistivity; r_c : cytoplasmic resistivity; r_{gap} : gap junction resistivity; c_d: specific capacitance of the intercalated disks; R_m and C_m : specific resistance and specific capacitance of the membrane).

The bidomain model parameters were computed on a 3D tissue slab using spatial discrete Fourier transforms. They were fitted using the SolvOpt solver (Kuntsevich and Kapper, 1997), which is based on a modified Shor's r-algorithm, in order to obtain a potential distribution minimizing the difference between the simulated and measured impedances along both the longitudinal and transverse orientations. The membrane capacitance C_m was fixed, according to the literature (Chapman and Fry, 1978), at 1 $\mu F/cm^2$ and the assumption was made that it was not significantly modified in acute myocardial ischemia. The β parameter was fixed at the control value measured prior to occlusion (500 cm^{-1} to 1000 cm^{-1}) although it is known to increase by 19% during the first hour after occlusion because of cell swelling (Tranum-Jensen *et al.*, 1981).

To reduce the number of unknown parameters, the fitting process was performed in two passes. In the first pass, a simpler model, which neglects the gap junction resistivity and the capacitance of the intercalated disks, was used to fit the low frequency measurements (up to 1000 Hz). The extracellular parameters (r_{eL}, r_{eT}) obtained from the first pass were then fixed and used in the second pass which fits the complete model over all frequencies. The fitting process yields the following parameters: r_{eL}, r_{eT}, r_c, c_d, r_{gap}, R_m and N. Intracellular longitudinal and transverse resistivities, r_{iL} and r_{iT}, are calculated by considering a direct current, thus neglecting the intercalated disk's specific capacitance $r_{iL} = r_{gap} + r_c$; $r_{iT} = N\, r_{gap} + r_c$.

Statistical analysis

The different impedance measurements (amplitude and phase) and conductivity values computed with the model for each animal were averaged for all animals and presented as mean ± standard error of the mean. Statistical comparison between mean values was performed with the Student *t* test.

4.6 RESULTS

Among the 13 animals, one died from complications while setting up the experiment, and another one was excluded because the impedance probe was not adequately positioned over the ischemic region. Fig. 4.2,A shows that ventricular fibrillation had occurred in 8 animals by 7 min of occlusion (corresponding to the end of the first phase of ischemic arrhythmias – phase Ia, ref. (Kaplinsky *et al.,* 1979)) and that fibrillation had occurred in all animals by 37 min (corresponding to the end of the second phase of ischemic arrhythmias - phase Ib (Kaplinsky *et al.,* 1979)). Complete data are available in only 4 animals in which all attempts at defibrillation were successfully performed (Fig. 4.2,B).

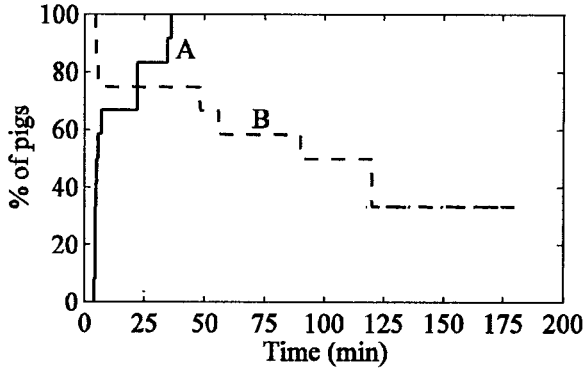


Figure 4.2 Percentage of pigs : A, who fibrillated; B, who survived (n=12).

4.6.1 Impedance measurements

Fig. 4.3 shows the time course of impedance measurements made at 5 of the 10 frequencies in the longitudinal and transverse orientations in a representative experiment. The impedance amplitude curves (Fig. 4.3,A and 4.3,B) followed a typical pattern (Cinca *et al.,* 1997; Smith *et al.,* 1995) in which there was a gradual increase from control pre-occlusion values at all current frequencies until stabilization occurred, reaching a plateau by 100 min. Similar trends occurred in the 3 other animals in which a complete protocol was performed. Table 4.1,A shows pre-occlusion amplitude measurements made in all animals (n=12) and the plateau measurements made in the 4 animals with a complete protocol. Plateaus were not attained at the same time in each

and, therefore, the statistics reported in Table 4.1 were computed at slightly different times post-occlusion (100-130 min).

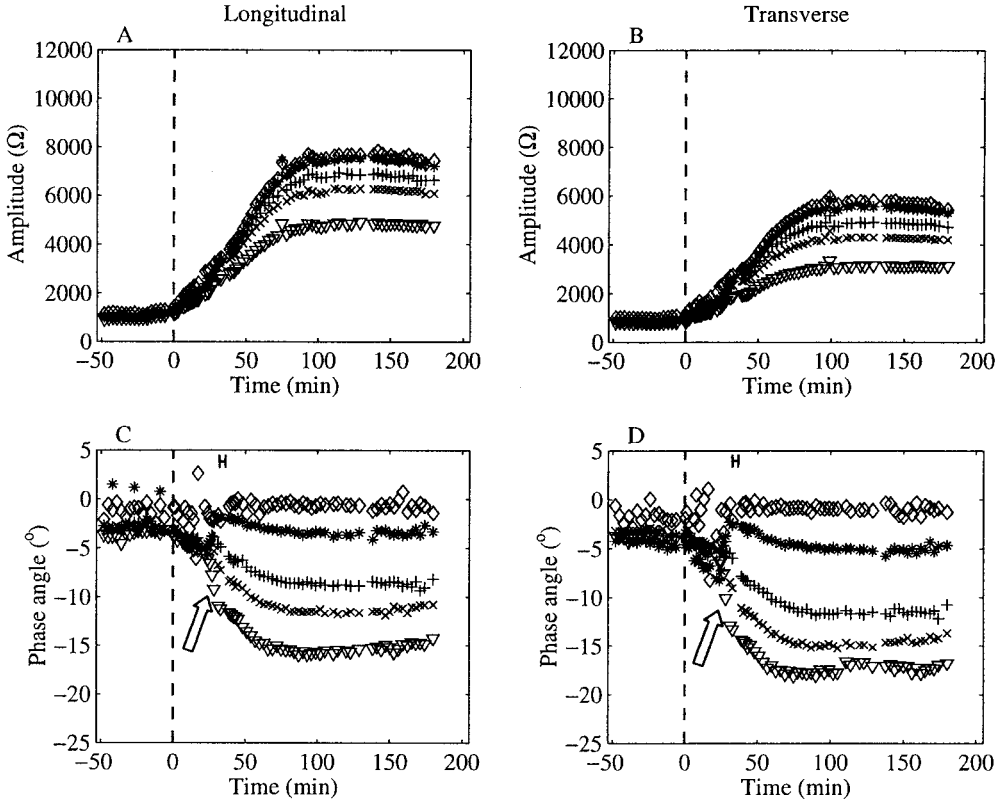


Figure 4.3 Amplitude and phase angle of the measured impedance in both longitudinal and transverse directions prior and up to 3 hours following LAD occlusion. (∇ : 10 kHz; × : 2.2 kHz; + : 1 kHz; * : 220Hz; ◊ : 12 Hz; H : fibrillation episode; arrow : cellular uncoupling.

The phase angle curves (Fig. 4.3,C and D) displayed patterns different from the ones displayed by amplitude. Phase angle remained fairly constant at the low frequency (12 Hz) while at higher frequencies it decreased (lag) until stabilization occurred. An

additional phenomenon was detected at the sampling site used in 2 experiments, in the form of a rapid phase angle change occurring abruptly at the high frequency, 10 kHz (longitudinal: -4.0±0.5°; transverse: -5.0 ±1.7° indicated by arrows at 25 min of occlusion in Fig. 4.3,C-D, and occurring at 74 min in the other experiment). This abrupt phase lag was interpreted as the sudden occurrence of marked cellular uncoupling at the sampling site. Interestingly, this phase lag was followed immediately by the occurrence of ventricular fibrillation (indicated by "H" in Fig. 4.3C-D). In the 2 other experiments, the phase angle measured at high frequency decreased gradually, and ventricular fibrillation occurred at different times without detection of an abrupt decrease in phase angle at the sampling site. Overall, the phase angles (Table 4.1,B) did not show any significant difference between the plateau and pre-occlusion values at the 12-220 Hz frequencies but statistically significant decreases between the two occurred at high frequency currents ($\geq$ 1 kHz).

Table 4.1: Impedance measurements.

A. Amplitude (Ω)

Frequency	Control (n=12)		Plateau (n=4)	
	Longitudinal	Transverse	Longitudinal	Transverse
12 Hz	1562±102	1474±96	5177±817	4273±585
220 Hz	1433±83	1334±81	5087±812	4209±569
1 kHz	1338±76	1246±73	4745±698	3920±491
2.2 kHz	1305±76	1223±71	4433±618	3605±398
10 kHz	1232±68	1166±68	3511±433	2855±207
B. Phase angle (°)				
12 Hz	-1.5±0.4	-1.5±0.3	-0.5±0.2	-0.6±0.1
220 Hz	-4.4±0.5	-4.2±0.4	-2.8±0.5	-3.1±0.7
1 kHz	-3.2±0.3	-3.1±0.2	-6.9±1.2	-7.4±1.6
2.2 kHz	-3.0±0.3	-3.2±0.2	-9.4±1.6	-10.1±1.9
10 kHz	-3.9±0.3	-4.5±0.3	-13.6±1.7	-14.2±2.0

Statistics were computed from averaged measurements repeated over 9 min under control (pre-occlusion) and plateau conditions. Data are mean±S.E.M.

4.6.2 Bidomain parameters

To interpret the impedance changes, bidomain resistivities and other parameters were computed from the bidomain mathematical model. The interstitial resistivity followed a pattern similar to the one displayed by the impedance amplitude, *i.e.* a

gradual increase beginning immediately after occlusion, followed by stabilization and a plateau after 70 min (Fig. 4.4,A: same preparation as illustrated in Fig. 4.3). The intracellular resistivity (Fig. 4.4,B) also increased but according to a different course in which there was a more abrupt and marked increase (×500) after 25 min of occlusion (coinciding with the occurrence of an abrupt phase lag and fibrillation). Overall, the

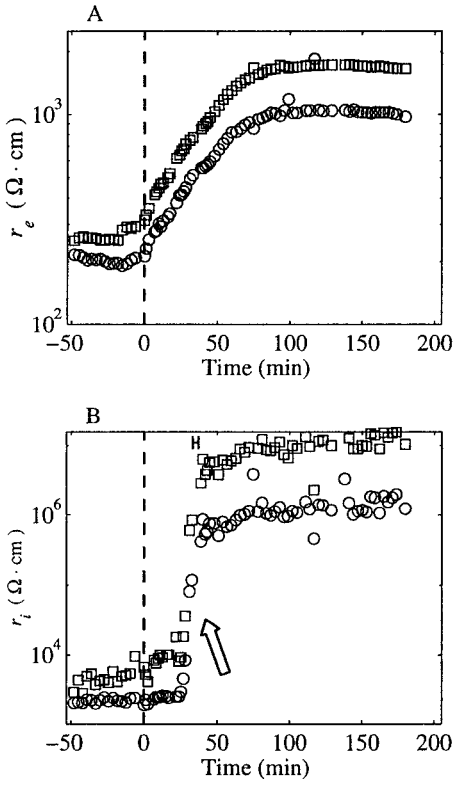


Figure 4.4 Interstitial (r_e) and intracellular (r_i) resistivities prior and up to 3 hours after the LAD occlusion. (○ : longitudinal; □ : transverse; H : fibrillation episode; arrow : cellular uncoupling). Same animal as for Figure 4.3.

increase in intracellular resistivity was much larger (×200 to ×1000) than the increase in interstitial resistivity (about ×3) as shown in Table 4.2. The sudden increase in intracellular resistivity occurred at 48±22 min after occlusion in the 4 experiments lasting for the complete protocol, and this coincided with the abrupt change in phase angle in the 2 experiments in which this was detected. The increase of r_i was interpreted as a marker of cellular uncoupling (along with the abrupt phase lag).

When the parameters incorporated into intracellular resistivity (r_c, r_{gap}, c_d) were considered (Fig. 4.5), the cytoplasmic resistivity r_c was seen to increase more gradually and to a smaller degree (panel A) whereas the junction/disk parameters (r_{gap}, c_d) displayed rapid and marked changes (panels B and C) which coincided in time with the increase in intracellular resistivity (see above, Fig. 4.4,B), thus supporting the interpretation of cellular uncoupling. The longitudinal junction ratio N also increased (Fig. 4.5,D). Table 4.2 shows that the gap junction resistivity r_{gap} increased markedly (×460) whereas the cytoplasmic resistivity r_c remained unchanged (×1.5). Interestingly, the specific capacitance of the intercalated disks c_d was reduced by a factor of 3 and, moreover, there was a four-fold increase in the N parameter that suggested alterations in the distribution of gap junctions. Membrane resistivity R_m remained unchanged (or slightly increased), an indication of sarcolemmal integrity.

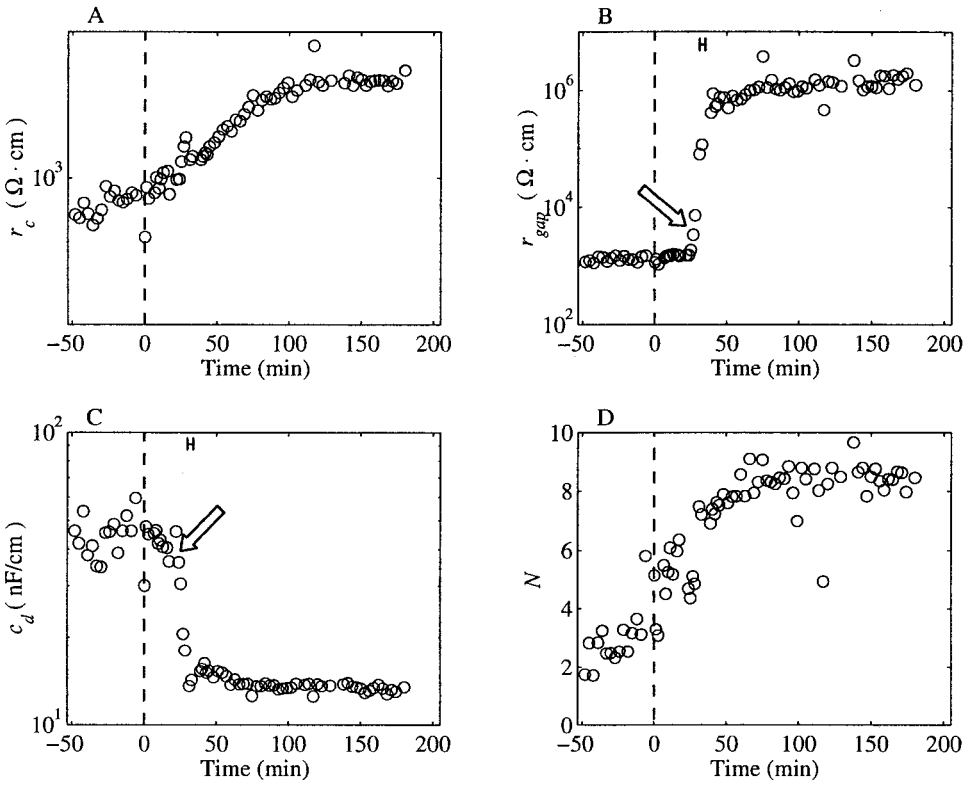


Figure 4.5 Intracellular parameters prior and up to 3 hours following LAD occlusion. (r_c : cytoplasmic resistivity; r_{gap} : gap junction resistivity; c_d : intercalated disk specific capacitance; N : transverse to longitudinal ratio of junction density; H : fibrillation episode; arrows : cellular uncoupling). Same animal as for Figure 4.3.

Table 4.2. Bidomain model parameters.

Parameters	Control (n=12)	Plateau (n=4)
r_{eL} (Ω·cm)	335.4±27.2	866.6±130.4
r_{eT} (Ω·cm)	349.7±22.3	1165.5±182.4
r_{iL} (Ω·cm)	2372.1±196.2	$5.61\text{x}10^5$±$1.95\text{x}10^5$
r_{iT} (Ω·cm)	3203.8±860.8	$4{,}51\text{x}10^6$±$1.72\text{x}10^6$
r_c (Ω·cm)	1043.7±58.2	1587±142.7
r_{gap} (Ω·cm)	1328.4±153.8	$5.59\text{x}10^5$±$1.95\text{x}10^5$
c_d (nF/cm)	53.3±10.8	15.46±2.92
N	1.30±0.32	5.40±1.99
R_m (kΩ·cm^2)	$8.45\text{x}10^6$±$2.04\text{x}10^6$	$2.58\text{x}10^7$±$2.16\text{x}10^6$

Data are mean±S.E.M.

4.7 DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The changes in impedance amplitude observed after coronary artery occlusion were similar to the ones reported previously (Cinca *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1995). Also, our impedance measurements performed at multiple frequencies expand on the results obtained at a single frequency (1110 Hz) by Cinca *et al.* (1997) who reported

rapid changes of the phase angle at ~30 min after occlusion. We observed no phase shifts for the low frequency currents (< 220 Hz) but sudden phase lags were observed for the high frequency currents (> 1000 Hz). Since low frequency currents injected through close extracellular electrodes remain mostly in the interstitial domain, they are not affected by alterations of the cell-to-cell coupling. This supports the interpretation that gap junction impairment diverts the intracellular currents flowing between neighboring cells from gap junctional resistive pathways to the capacitive pathways of the intercalated disks (Cinca *et al.,* 1997). This interpretation is supported by the model analysis since the sudden impedance phase lag measured with the high frequency currents corresponded to a sudden increase of the computed gap junction resistivity in the same animals. Sudden phase lags were not observed in all 4 experiments that showed an increased junction resistivity, probably because the computer model allows for a more sensitive analysis of the impedance data.

The modeling results go beyond the interpretation of the impedance measurements and suggest structural changes to the myocardium. Thus, the decrease of the specific capacitance of the intercalated disk c_d could be due to an increased distance between the adjoining membranes at the intercalated disks. Also, the gradual increase of the longitudinal junction ratio N suggests a reorganization of the gap junctions on the surface of the cells during ischemia. Acute myocardial ischemia has well known effects on the structure, distribution and properties of the gap junctions. Ashraf and Halverson

(1978) observed ultrastructural changes of the gap junctions after 45 minutes of ischemia whereas McCallister *et al.* (1979) reported that the majority of gap junctions are dissociated after 24 minutes of ischemia. The degradation of the myocardial phospholipids also seems to be involved in these dysfunctions (Daleau, 1996). The fundamental relationship between structure (gap junctions) and function (resistivity) can only be investigated by direct measurements of the passive electrical properties, which is now possible with our new method.

4.7.1 Cell-to-cell coupling and fibrillation

The passive electrical properties of the myocardium play a fundamental role during impulse propagation in both normal and abnormal myocardium. For example, Shaw and Rudy (1997) found that a reduction of cell-to-cell coupling reduces the conduction velocity to much lower values before conduction block than a reduction of excitability, thus suggesting that abnormal coupling could play a greater role than abnormal excitability for the production of reentrant circuits. Decreased coupling also alters repolarization through electrotonic interactions and increases the heterogeneity of action potential duration, thus further facilitating reentry (Wilders *et al.,* 1996). Preliminary conclusions can be drawn from the fact that uncoupling was immediately followed by fibrillation in two experiments. However, our probe sampled resistivity from a very small region (approximately 0.5 mm^3 or 25,000 cells) which could hardly account for a global phenomenon such as reentry and fibrillation.

4.7.2 Limitations

The fact that resistivity measurements were obtained from only a single sampling site is thus a major limitation, especially with regard to our capacity to correlate resistivity changes with the occurrence of ventricular fibrillation. Another limitation is the need to apply defibrillation shocks repeatedly and the loss of animals prior to completing the protocol because of the occurrence of ventricular fibrillation related to excitability changes in the early phase of arrhythmias following coronary occlusion. There was also a possibility that preconditioning might have been induced during the temporary occlusion used to localize the ischemic area prior to performing the protocol. Finally, we did not detect the expected anisotropic ratio of the observed resistivities ($r_{eL}/r_{eT} = 0.96$ and $r_{iL}/r_{iT} = 0.74$, pre-occlusion) considering that the mean ratio of the observed conduction speeds at the same sites was 2.3±0.4. However, the resistivity values were well within the physiological range (Le Guyader *et al.*, 2001). The possible presence of a fluid layer between the myocardium and the electrodes and/or the finite size of the electrodes (Wang *et al.*, 1998) are possible reasons explaining our failure to detect an anisotropic resistivities. However, the observed changes and comparisons that were made between pre- and post-occlusion measurements are probably valid in *relative* if not *absolute* terms.

4.7.3 Conclusions

The instrument and the model used in this study allow the observation of electrical uncoupling during acute ischemia in a way never seen before. It discriminates

the time course of the interstitial, cytoplasmic and gap junction resistivities during ischemia.

4.8 ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported, in part, by the National Science and Engineering Research Council of Canada, the Heart & Stroke Foundation of Quebec, and the Canadian Institutes of Health Research. The authors also want to acknowledge the excellent technical work of Caroline Bouchard and the expertise of Michel Vermeulen, Bruno Dubé and Denis Guerette from the Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal.

CHAPITRE 5

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Ce chapitre présente une synthèse des principaux éléments présentés dans l'article en plus d'une discussion concernant le système de mesure. Il présente les résultats obtenus, leur interprétation, les limites et recommandations concernant le système de mesure et les principales conclusions de ce mémoire.

5.1 SYNTHÈSE DES RÉSULTATS

Des 13 porcs impliqués dans cette étude, seulement 4 ont été en mesure de poursuivre le protocole en entier (Figure 4.2B). En effet, après 37 minutes d'occlusion, ce qui correspond à l'instant suivant la phase Ib d'arythmies ischémiques (Kaplinsky *et al.,* 1979), tous les porcs avaient fibrillé au moins une fois (Figure 4.2A).

5.1.1 Mesures d'impédance

Tel que montré aux Figures 4.3A et 4.3B et rapporté par plusieurs autres auteurs (Cinca *et al.,* 1997; Smith *et al.,* 1995; Fallert *et al.,* 1993), les amplitudes des impédances longitudinales et transverses subissent toutes les deux une augmentation suite à une occlusion de l'artère coronaire interventriculaire antérieure (IVA) pour atteindre un plateau, environ 100 minutes suivant l'occlusion (Tableau 4.1). Cette augmentation est due à plusieurs facteurs, à court terme, à la diminution de la pression de perfusion associée à une diminution du volume intracellulaire et, à long terme, cela

pourrait être dû à une diminution du volume interstitiel et au découplage cellulaire (Kléber *et al.*, 1987).

Alors que pour l'amplitude de l'impédance la forme des courbes est identique peu importe la fréquence, pour la phase de l'impédance, le phénomène diffère largement selon la fréquence. En effet, tel que démontré aux Figures 4.3C et 4.3D, les basses fréquences (12 Hz – 220 Hz) ne sont presque pas modifiées par l'occlusion alors que les hautes fréquences ($\geq$ 1 kHz) subissent une chute statistiquement significative. De plus, pour deux des quatre expériences ayant satisfait le protocole complet, la presque totalité de la chute de phase à hautes fréquences se produit à l'intérieur de 8 minutes. Cette chute semblerait donc refléter un découplage cellulaire au site de mesure. Un fait à remarquer est que, pour ces deux expériences, cette chute fut immédiatement suivie d'une période de fibrillation.

5.1.2 Paramètres bidomaines

Les résistivités extracellulaires (r_{eL} et r_{eT}) ont suivi le même type de progression que l'amplitude de l'impédance soit une augmentation suivant l'occlusion, probablement causée par une diminution de la pression de perfusion à court terme et à une diminution du volume interstitiel à long terme, suivie de l'atteinte d'un plateau. Les résistivités intracellulaires (r_{iL} et r_{iT}) ont également augmenté mais seulement après 48±22 minutes d'occlusion (coïncidant avec la diminution de phase observée lors de deux expériences). Les augmentations de r_{iL} et r_{iT} furent interprétées comme marqueur du découplage

cellulaire. En effet, en observant les paramètres composants les résistivités intracellulaires (r_c, r_{gap}, c_d) de façon indépendante (Figure 4.5A, 4.5B, 4.5C), on remarque que les paramètres des disques intercalaires/jonction (r_{gap}, c_d), ont été sujets à une variation très brusque correspondant à l'augmentation des résistivités intracellulaires alors que r_c n'a subit qu'une augmentation progressive. Pour ce qui est des autres paramètres du modèle, N a subit une augmentation importante suggérant une modification de la distribution des jonctions gap tandis que R_m n'a subit qu'une légère augmentation qui peut être interprétée comme une indication de l'intégrité de la membrane du sarcolemme.

5.2 INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

5.2.1 Observation du découplage cellulaire

Les changements dans l'amplitude de l'impédance observée sont tels que rapportés dans la littérature (Cinca *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1995). Par contre, les mesures d'impédance effectuées à plusieurs fréquences ont permis d'observer qu'aucun changement de phase n'est présent durant l'ischémie lorsqu'un courant à basse fréquence (< 200 Hz) est injecté alors qu'un retard important apparaît lorsqu'un courant à haute fréquence (> 1000 Hz) est injecté. Cela est dû au fait que le courant à hautes fréquences est capable de pénétrer la membrane cellulaire comparativement au courant à basses fréquences et supporte l'interprétation que l'altération des jonctions gap a pour effet de dévier le courant intracellulaire circulant entre deux cellules voisines des jonctions gap (résistives) vers les disques intercalaires (capacitives) (Cinca *et al.*, 1997).

De plus, cette interprétation est supportée par le modèle bidomaine puisque le retard de phase coïncide avec une augmentation de la résistivité des jonctions gap.

Également, le modèle nous permet une interprétation plus poussée des modifications du myocarde durant l'ischémie. Premièrement, la diminution de la capacité spécifique des disques intercalaires c_d pourrait être due à une augmentation de la distance entre les membranes adjacentes des disques intercalaires. De plus, l'augmentation de N suggère une réorganisation des jonctions gap à la surface des cellules durant l'ischémie. Plusieurs auteurs rapportent des modifications de la structure, de la distribution et des propriétés des jonction gap (Daleau, 1996; McCallister *et al.* 1979; Ashraf et Halverson, 1978). Cependant, les relations fondamentales entre la structure (jonction gap) et la fonction (résistivité) ne peuvent être observées que par des mesures directes des propriétés passives du myocarde qui sont possibles avec le système présenté.

5.2.2 Lien entre le couplage cellulaire et la fibrillation

Les propriétés électriques passives du myocarde jouent un rôle fondamental durant la propagation du potentiel d'action dans le myocarde normal et anormal (Shaw et Rudy 1997; Wilders *et al.,* 1996). Le fait que le découplage cellulaire est suivi par une période de fibrillation lors de deux expériences nous permet d'émettre des conclusions préliminaires cependant, puisque notre sonde ne mesure l'impédance que

sur une très petite région (approximativement 0.5 mm^3 ou 25 000 cellules), il est très difficile de conclure sur une phénomène global tel que la réentrée ou la fibrillation.

5.3 SYSTÈME DE MESURE: LIMITES ET RECOMMANDATIONS

5.3.1 Limites et recommandations concernant la théorie

Plusieurs problèmes engendrés par le fait que le système de mesure ait été conçu afin d'effectuer des mesures dans un environnement *in vitro* imposent des limites au système lorsqu'on l'utilise dans un environnement *in vivo*. Ces limites touchent autant la théorie que l'électronique.

Un premier problème pourrait se poser quant à la précision des mesures en situation *in vivo*. En effet, tel que mentionné précédemment, l'impédance varie en fonction du cycle cardiaque (Steendijk *et al.,* 1993). Or, le système actuel conserve environ 16 cycles pour chaque mesures effectuées peut importe la fréquence de stimulation. En enregistrant 16 cycles à une fréquence de 12 Hz, le temps d'acquisition total est de 1,33 secondes ((16 cycles)/(12 cycles/s)). Pour une fréquence de battement de 120 battements/minute, qui correspond à 0,5 s/battement, une acquisition à une fréquence de 12 Hz correspond donc à mesurer la moyenne de l'impédance sur un peu moins de 3 cycles ((1,33 s)/(0,5 s/battement)). Par contre, pour une fréquence de 10 kHz, le temps d'acquisition n'est que de 1,6 ms ((16 cycles)/(10000 cycles/s)) soit environ 0,0032 battement ((1,6 ms)/(0,5 s/battement)). Les basses fréquences (jusqu'à 50 Hz) mesurent donc une moyenne de l'impédance sur quelques cycles alors que les

hautes fréquences effectuent des mesures d'impédance ponctuelles. Ces deux mesures ne correspondent donc pas tout à fait au même phénomène, une étant la moyenne et l'autre une mesure ponctuelle, mais toutes deux sont utilisées simultanément afin de déterminer les paramètres bidomaines du myocarde. La variation subit par l'impédance pendant un cycle cardiaque n'est cependant que d'environ 7%. Selon la précision désirée, ce système peut être tout à fait acceptable, par contre, si on désire obtenir des mesures exactes, il faudrait peut-être procéder autrement en permettant une mesure sur un nombre de cycle variable selon la fréquence et fixer plutôt le temps d'acquisition.

De plus, 30 secondes environ séparent les mesures effectuées selon les orientations longitudinale et transverse. Dans la plupart des protocoles cela ne cause pas de problèmes significatifs. Par contre, lors des premiers instants de l'ischémie, les résistivités changent rapidement et ces 30 secondes pourraient avoir une incidence sur l'exactitude des résultats durant cette période de temps car les mesures selon les orientations longitudinale et transverse sont utilisées afin de déterminer une série de paramètres. Actuellement, l'ensemble des mesures sont prises selon une orientation pour toutes les fréquences et ensuite selon l'autre orientation pour toutes les fréquences. Il ne serait pas utile de prendre les mesures une fréquence à la fois pour les deux orientations successivement afin de limiter cet écart de 30 secondes car cette façon de faire apporterait un autre problème en éloignant dans le temps les mesures effectuées en basses fréquences et en hautes fréquences. Il faudrait donc plutôt tenter de réduire le temps d'acquisition pour chaque fréquence afin de diminuer cet écart de 30 secondes.

Également, d'après Tranum-Jensen *et al.* (Tranum-Jensen *et al.,* 1981), la fraction du volume intracellulaire (ξ) augmente d'environ 20% durant la première heure d'ischémie. Ce résultat a été obtenu grâce à des mesures de diamètre cellulaire sur des coupes de cellules. Quoique ce type de mesure demeure hautement imprécise, on peut quand même penser que la cellule subit une augmentation de volume significative durant la première heure de l'ischémie. La fraction du volume intracellulaire fut fixée à 0,7 puisque sa variation n'a pas été étudiée lors de ce protocole. Ce fait pourrait également avoir des effets sur la précision des mesures.

D'autres problèmes se posent en ce qui concerne l'électronique. En effet, le fait de ne pas pouvoir utiliser le polygraphe en salle d'opération dû à des problèmes de bruit serait inacceptable lors d'études impliquant des patients humains. Plusieurs améliorations au système d'acquisition actuel pourraient être effectuées afin de limiter la contamination des signaux par le bruit et ne pas être contraint à éliminer certains appareils. Premièrement, il serait sûrement utile de blinder les câbles liant la sonde au circuit d'acquisition afin de limiter la contamination au bruit. Dans le même ordre d'idée, il serait également intéressant de placer les préamplificateurs le plus près possible des électrodes de façon à amplifier le signal immédiatement après l'avoir capté et donc limiter l'effet du bruit sur les mesures. Finalement, la source de courant, qui est actuellement limitée à 2,5 μA, pourrait facilement être augmentée à 10 μA à l'instar de la plupart des auteurs ayant effectué ce genre de mesures (Schwartzman *et al.,* 1999;

Cinca *et al.,* 1997; Smith *et al.,* 1995). Cette façon de faire permettrait d'augmenter les potentiels mesurés et là encore de diminuer l'effet du bruit sur les mesures.

5.3.2 Recommandations concernant la sonde

Tel que mentionné précédemment, il est possible que le faible rapport d'anisotropie soit lié à la géométrie des électrodes. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de diminuer le diamètre des électrodes ou d'augmenter la distance inter-électrode. Cependant, un équilibre doit être atteint. En effet, en diminuant trop le diamètre des électrodes, on augmente l'impédance de ces dernières, ce qui a pour effet d'augmenter l'effet du bruit sur les signaux. De plus, en augmentant trop la distance inter-électrode, on n'est plus en mesure d'avoir un apport seulement du milieu interstitiel à basses fréquences et donc on ne peut plus différencier entre les conductivités intracellulaires et interstitielles. Il serait donc utile de concevoir des électrodes de dimensions variables et de vérifier leurs comportements lors de mesures prises selon des conditions identiques.

5.4 CONCLUSIONS

Le système de mesure d'impédance, jumelé au modèle bidomaine anisotrope incluant les jonctions gap, a permis d'observer clairement le découplage cellulaire en situation *in vivo* ce qui était auparavant impossible. En effet, il a été possible d'observer les changements subis par les résisitivités interstitielle, cytoplasmique et des jonctions gap durant l'ischémie. Les modifications apportées au système de mesure afin de le

rendre opérable dans un environnement *in vivo* pourraient permettre d'utiliser ce système dans beaucoup d'autres types de protocoles visant l'étude du découplage cellulaire. Par exemple, des études désirant observer la réponse à certains médicaments anti-arythmiques, ou désirant observer le couplage cellulaire lors de reperfusion ou lors de stimulations rapides de l'oreillette pourraient être entreprises. Ce système pousse donc un peu plus loin les limites de la science et nous permet de pénétrer aux confins de la cellule lorsque celle-ci est encore dans son environnement naturel, son environnement *in vivo*...

REFERENCES

ASHRAF M. et HALVERSON C. (1978). Ultrastructural modifications of nexuses (gap junctions) during early myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, 10, 263-269.

BERNE R. M. et LEVY M. N. (1992) *Cardiovascular physiology 7th edition.* Mosby, St. Louis, Missouri.

CASCIO W. E., YAN G. X. et KLÉBER A. G. (1990). Passive electrical properties, mechanical activity, and extracellular potassium in arterially perfused and ischemic rabbit ventricular muscle. *Circ Res*, 66, 1461-1473.

CHAPMAN R. A. et FRY C. H. (1978). An analysis of the cable properties of frog ventricular myocardium. *J Physiol (Lond)*, 283, 263-282.

CINCA J., WARREN M., CARRENO A., TRESÀNCHEZ M., ARMADANS L., GOMEZ P. et SOLER-SOLER J. (1997). Changes in myocardial electrical impedance induced by coronary artery occlusion in pigs with and without preconditioning. *Circulation*, 96, 3079-3086.

CLERC L. (1976). Directional differences of impulse spread in trabecular muscle from mammalian heart. *J Physiol*, 255, 335-346.

DALEAU P. (1996). Effects of lysophosphatidylcholine on intercellular resistance of Guinea pig ventricular cellular pairs. *Circulation*, 94, 1-9.

DALEAU P. (1998). Effects of antiarrhythmic agents on junctional resistance of guinea pig ventricular cell pairs. *J Pharmacol Exp Ther*, 284(3), 1174-1179.

FALLERT M. A., MIROTZNIK M. S., DOWNING S. W., SAVAGE E. B., FOSTER K. R., JOSEPHSON M. E. et BOGEN D. K. (1993). Myocardial electrical impedance mapping of ischemic sheep hearts and healing aneurysms. *Circulation*, 87, 199-207.

GEDDES L. A. et BAKER L. E. (1967). The specific resistance of biological material - A compendium of data for the biomedical engineer and physiologist. *Med Biol Eng*, 5, 271-293.

GULRAJANI, R. M. (1998) *Bioelectricity and biomagnetism.* John Wiley & Sons.

HILL J. L. et GETTES L. S. (1980). Effect of acute coronary artery occlusion on local myocardial extracellular K^+ activity in swine. *Circulation*, 61, 768-778.

KAMEYAMA M. (1983). Electrical coupling between ventricular paired cells isolated from guinea-pig heart. *J Physiol*, 336, 345-57.

KAPLINSKY E., OGAWA S., BALKE C. W. et DREIFUS L. S. (1979). Two periods of early ventricular arrhythmia in the canine acute myocardial infarction model. *Circulation*, 60, 397-403.

KLÉBER A. G., RIEGGER C. B. et JANSE M. J. (1987). Electrical uncoupling and increase of extracellular resistance after induction of ischemia in isolated, arterially perfused rabbit papillary muscle. *Circ Res*, 61, 271-279.

KUNTSEVICH A. et KAPPER F. (1997) *SolvOpt the Solver for Local Nonlinear Optimization Problems, version 1.1 in Matlab.* Institut for Mathematics: Karl-Franzens University of Graz.

LE GUYADER P., TRELLES F. et SAVARD P. (2001). Extracellular measurement of anisotropic bidomain myocardial conductivites. I. Theoretical analysis. *Ann Biomed Eng*, 29(10), 862-877 .

MARRESE C. A. (1987). Strongly adherent platinum black coating. *Anal chem*, 59, 217-218.

MCCALLISTER L. P., TRAPUKDI S. et NEELY J. R. (1979). Morphometric observations on the effects of ischemia in the isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 11, 619-630.

NOMA A. et TSUBOI N. (1987). Dependance of junctional conductance on proton, calcium and magnesium ions in cardiac paired cells of guinea pig. *J Physiol (Lond)*, 382, 193-211.

PLONSEY R. (1969) *Bioelectric Phenomena.* McGraw-Hill Book Company, New York.

PLONSEY R. et BARR R. (1982). The four-electrode resistivity technique as applied to cardiac muscle. *IEEE Trans Biomed Eng*, 29, 541-546.

PLOURDE E., SAVARD P. et LE GUYADER P. (2000). Electrical alignment of a cardiac impedance probe. Proceedings of Computers in Cardiology, Cambridge MA.

ROBERTS D. E., HERSCH L. T. et SCHER A. M. (1979). Influence of cardiac fiber orientation on wavefront voltage, conduction velocity, and tissue resistivity in the dog. *Circ Res*, 44 , 701-712.

ROVETTO M. J., LAMBERTON W. F. et NEELY J. R. (1975). Mechanisms of

glycolytic inhibition in ischemic hearts. *Circ Res*, 37, 742-751.

RUSH S., ABILDSKOV J. A. et MCFEE R. (1963). Resistivity of body tissue at low frequencies. *Circ Res*, 12, 40-50.

SAFFITZ J. E., SCHUESSLER R. B. et YAMADA K. A. (1999). Mechanisms of remodeling of gap junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias. *Cardiovasc Res*, 42, 309-317.

SANTÉ CANADA. (1997). En ligne: http://cytheria.ic.gc.ca/dsol/cvd. Consulté le 1 mars 2001.

SCHWAN H. P. (1963). Determination of biological impedance. In *Physical Techniques in Biological Research*. Academic Press, 6 ptB, 323-407.

SCHWAN H. P. et KAY C. (1956). Specific resistance of body tissues. *Circ Res*, 4, 664-670.

SCHWARTZMAN D., CHANG I., MICHELE J. J., MIROTZNIK M. S. et FOSTER K. R. (1999). Electrical impedance properties of normal and chronically infarcted left ventricular myocardium. *J Interv Card Electrophysiol*, 3, 213-224.

SHAW R. M. et RUDY Y. (1997). Ionic mechanisms of propagation in cardiac tissue. Roles of the sodium and L-type calcium currents during reduced excitability and decreased gap junction coupling. *Circ Res*, 81, 727-741.

SMITH W. T., FLEET W. F., JOHNSON T. A., ENGLE C. L. et CASCIO W. E. (1995). The Ib phase of ventricular arrhythmias in ischemic in situ porcine heart is

related to changes in cell-to-cell electrical coupling. *Circulation*, 92, 3051-3060.

SPERELAKIS N. et HOSHIKO T. (1961). Electrical impedance of cardiac muscle. *Circ Res*, 9, 1280-1283.

STEENBERGEN C., MURPHY E., LEVY L. et LONDON R. E. (1987). Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res*, 60, 700-707.

STEENDIJK P., MUR G., VAN DER VELDE E. T. et BAAN J. (1993). The four-electrode resistivity technique in anisotropic media: theoretical analysis and application on myocardial tissue in vivo. *IEEE Trans Biomed Eng*, 40, 1138-1148.

STEENDIJK P., VAN DER VELDE E. T. et BAAN J. (1994). Dependence of anisotropic myocardial electrical resistivity on cardiac phase and excitation frequency. *Basic Res Cardiol*, 89, 411-426.

STEENDIJK P., VAN DIJK A. D., MUR G., VAN DER VELDE E. T. et BAAN J. (1993). Effect of coronary occlusion and reperfusion on local electrical resistivity of myocardium in dogs. *Basic Res Cardiol*, 88(2), 167-178.

SUGIURA H., TOYAMA J., TSUBOI N., KAMIYA K. et KODAMA I. (1990). ATP directly affects junctional conductance between paired ventricular myocytes isolated from guinea pig heart. *Circ Res*, 66, 1095-1102.

TRANUM-JENSEN J., JANSE M. J., FIOLET J. W. T., KRIEGER W. J. G., NAUMANN D'ALNONCOURT C. et DURRER D. (1981). Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine

heart. *Circ Res*, 49, 364-381.

VAN OOSTEROM A., DE BOER R. W. et VAN DAM R. T. (1979). Intramural resistivity of cardiac tissue. *Med Biol Eng Comput*, 17, 337-343.

WANG Y., SCHIMPF P. H., HAYNOR D. R. et KIM Y. (1998). Geometric effects on resistivity measurements with four-electrode probes in isotropic and anisotropic tissues. *IEEE Trans Biomed Eng*, 45, 877-884.

WEIDMANN S. (1970). Electrical constants of trabecular muscle from mammalian heart. *J Physiol*, 210, 1041-1054.

WEINGART R. (1986). Electrical properties of the nexal membrane studied in rat ventricular cell pairs. *J Physiol*, 370, 267-284.

WEISS J. et SHINE K. I. (1982). Extracellular K+ accumulation during myocardial ischemia in isolated rabbit heart. *Am J Physiol*, 242, H619-H628.

WILDERS R., KUMAR R., JOYNER R. W., JONGSMA H. J., VERHEIJCK E. E., GOLOD D., VAN GINNEKEN C. G. et GOOLSBY W. N. (1996). Action potential conduction between a ventricular cell model and an isolated ventricular cell. *Biophys J*, 70, 281-295.

WU J., MCHOWAT J., SAFFITZ J. E., YAMADA K. A. et CORR P. B. (1993). Inhibition of gap junctional conductance by long-chain acylcarnitines and their preferential accumulation in junctional sarcolemma during hypoxia. *Circ Res*, 72, 879-889.

ZMYSLINSKI R. W., AKIYAMA T., BIDDLE T. L. et SHAH P. M. (1979). Natural course of ST segment and QRS complex in patients with acute anterior myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 43 , 29-34.

ANNEXE I

GUIDE D'UTILISATION DU SYSTÈME DE MESURE D'IMPÉDANCE ET DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES DU MODÈLE BIDOMAINE ANISOTROPE INCLUANT LES JONCTIONS GAP

Par

Eric Plourde

École Polytechnique de Montréal

10 octobre 2001

GUIDE D'UTILISATION DU SYSTÈME DE MESURE D'IMPÉDANCE ET DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES DU MODÈLE BIDOMAINE ANISOTROPE INCLUANT LES JONCTIONS GAP

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 81

1 PLAQUAGE DES ÉLECTRODES 81

1.1 Solution de plaquage 81

1.2 Plaquage des électrodes 82

1.3 Préparation des solutions salines et vérifications du plaquage 82

2 BRANCHEMENT DU SYSTÈME DE MESURE 84

3 UTILISATION DU PROGRAMME D'ACQUISITION 85

3.1 Programme d'acquisition 85

3.2 Visualisation d'une mesure 87

4 UTILISATION DES PROGRAMMES DE TRAITEMENT DES MESURES AFIN DE DÉTERMINER LES PARAMÈTRES DU MODÈLE BIDOMAINE ANISOTROPE À PARTIR DE L'IMPÉDANCE 88

4.1 Traitement des mesures expérimentales 88

4.1.1 *batch_process.m* 88

4.1.2 *batch_aut.m* 89

4.1.3 *batch_corr_aut.m* 90

4.1.4 *batch_cmp_aut.m* 90

4.1.5 *batch_merge_aut.m* 90

4.1.6 *batch_f2400_aut.m* 91

4.1.7 *batch_fit_aut.m* 91

4.2 Visualisation des résultats 94

4.2.1 *courbe_vsuri*.m* 94

4.2.2 *para_vs_t120*.m* 94

4.3 Nomenclature à utiliser pour la création des fichiers de mesure 95

INTRODUCTION

Ce guide vise à faciliter l'apprentissage de l'utilisation du système de mesure d'impédance et de détermination des résistivités. Il s'agit d'un recueil de différentes informations concernant le système de mesure pouvant servir de référence à l'utilisateur. Il ne vise pas à expliquer la théorie sous-tendant le système de mesure.

1 PLAQUAGE DES ÉLECTRODES

Le plaquage des électrodes est nécessaire afin d'abaisser l'impédance des ces dernières.

1.1 Solution de plaquage

La solution de plaquage est composée de :

0,5 M de HCl

0,025% d'acétate de Pb = 0,025 g/100 ml de solution

3% $PtCl_4$ (chlorure de platine) = 3 g/100 ml de solution

Les étapes à suivre afin de fabriquer la solution de plaquage sont les suivantes:

1 – Remplir une fiole de 100 ml à moitié d'eau, mettre 4,54 ml de HCl 11 M ((0,5 M)(100 ml)= (11 M)(x) -> x = 4,54 ml) et remplir la fiole d'eau jusqu'à 100 ml.

2 – Ajouter 0,025 g d'acétate de plomb au 100 ml de HCl 0,5 M.

3 – Ajouter 3 g de $PtCl_4$.

ATTENTION!!! : L'acétate de plomb et le chlorure de platine sont très toxiques. Le port d'un masque et de gants est requis.

1.2 Plaquage des électrodes

Étapes à suivre afin d'effectuer le plaquage des électrodes:

1 – Nettoyer les électrodes sous le microscope optique à l'aide du « kit de nettoyage » des électrodes.

2 – Déposer la solution de plaquage dans un récipient et mettre ce récipient dans le bain à ultrason, démarrer le bain à ultrason.

3 – Brancher la sonde (composée des deux rangées perpendiculaires de quatre électrodes) sur le circuit de sources de courant destiné au plaquage des électrodes.

4 – Déposer la sonde et l'électrode de platine (déjà fixée au circuit de sources de courant) dans la solution de plaquage.

5 – Brancher les sources de courant et effectuer le plaquage pendant 1 minute.

1.3 Préparation des solutions salines et vérification du plaquage

Les solutions salines sont nécessaires afin de vérifier le comportement des électrodes suite au plaquage afin de s'assurer d'un plaquage de qualité et elles permettent également de calibrer les électrodes afin de limiter l'erreur sur les mesures causée par des plaquages différents.

Préparation des solutions salines :

1 – Préparer les solutions salines en mélangeant de l'eau et du salin et en mesurant la conductivité de cette solution à l'aide du « conductivité-mètre » (Conductivity meter HI 8733, Hanna Instruments) jusqu'à l'obtention de la solution saline désirée (typiquement 2 mS, 5 mS et 10 mS).

2 – Après avoir branché le système de mesure et démarré le programme d'acquisition (voir les sections 2 et 3 de ce guide), vérifier que le plaquage des électrodes a été bien effectué en prenant des mesures dans les salins préparés. Une fois les mesures prises, vérifier, à l'aide du programme *visusal.m* de

```
visusal('test2.itp','nom_de_votre_fichier.sig',valeu
r_du_salin,rangée_d'électrodes_utilisée (T pour
transverse ou L pour longitudinale),
type_d'électrode,1)
ex:visusal('test2.itp','mesure.sig',2e-3,'T',
'mini',1)
```

(Note : Le fichier *test2.itp* doit se trouver dans le même répertoire)

Matlab que l'impédance mesurée est la même pour toutes les fréquences. La figure produite par le programme *visusal.m* devrait donner une ligne relativement droite (ligne mauve) autour de la valeur de conductivité mesurée (ligne rouge).

2 BRANCHEMENT DU SYSTÈME DE MESURE

Voici les étapes afin de brancher correctement le système de mesure :

1 – Sur le circuit d'acquisition (boîte verte et noire), brancher l'alimentation de la section isolée du circuit à l'aide de la pile (boîte noir) composée de 6 piles acide-plomb 6 V - 1,2 Ah rechargeables (Pour la procédure de rechargement, suivre la procédure p. 15 et la figure 5-4 p. 17 du manuel d'instruction du générateur de tension (GPC-3030D, Good Will Instrument Co.) en limitant le courant à 10 mA et en ajustant la tension à 20 V) et brancher l'alimentation non isolée (ELPAC Power Supply).

2 – Brancher la carte génératrice de tension (PCIP-SST) sur le circuit d'acquisition de même que les deux entrées (courant et tension) de la carte d'acquisition (PCIP-SCOPE).

3 – Brancher l'électrode de référence (AgCl) et la sonde sur le circuit d'acquisition.

3 UTILISATION DU PROGRAMME D'ACQUISITION

3.1 Programme d'acquisition

1 – Démarrer l'environnement MS-DOS (MS-DOS Prompt) du PC 486.

2 – Dans le répertoire 'PCIP', taper 'load' afin de charger la carte d'acquisition (PCIP-SCOPE) et la carte génératrice de fréquence (PCIP-SST).

3 – Dans le répertoire '`acquisition`' du PC 486, taper '`PROC10_3`' afin de lancer le programme d'acquisition qui utilise le port parallèle et '`PROC10_4`' afin de lancer celui qui n'utilise pas le port parallèle.

Les programmes d'acquisition offrent plusieurs options dont voici les principales:

C `Calibrer la source de courant`

Sert à calibrer la carte PCIP-SST, doit être effectué avant chaque utilisation du système.

A `Alignement électronique`

Permet de voir les signaux à l'écran avant l'enregistrement.

P `Programmation de la fréquence`

Sert à indiquer les différentes fréquences d'enregistrement (contenues dans le fichier '*process.dat*'). Vous devez consulter la liste des fréquences et choisir l'option '`Utiliser...`' pour que les fréquences deviennent actives.

E `Type d'électrode utilisée`

Sert à définir l'électrode (sonde) utilisée : l'électrode utilisée lors de la mesure d'impédance en situation ischémique est 'Mini 4+4 2 mil 27 mars 96'.

M Mesures

Effectue les mesures d'impédance selon les fréquences inscrites dans le fichier '*process.dat*'. Le programme vous demande le nom du fichier, on suggère d'utiliser la nomenclature exposée à la fin du chapitre 4 de ce guide afin de s'assurer du bon fonctionnement des programmes de traitement, entre autres, le nom des fichiers créés en utilisant les électrodes placées selon l'orientation transverse doivent absolument se terminer par 't' et ceux longitudinale par 'l'. Également, on vous demande:

'Desirez-vous acquerir une seule fréquence a la fois[O,N]?'

En répondant 'O', le système fera une mesure d'impédance selon une fréquence à la fois. Avant chaque acquisition, vous devrez appuyer sur 'R' afin d'enregistrer l'acquisition. En répondant 'N', le système fera l'acquisition selon toutes les fréquences automatiquement et une à la suite de l'autre.

N.B. Avec l'utilisation du programme d'acquisition 'PROC10_3', le port parallèle doit absolument recevoir un signal adéquat. Le signal est enregistré sur la borne 15 du port parallèle. Lors d'une

expérimentation, le signal provient du stimulateur cardiaque, il faut cependant s'assurer que le signal du stimulateur est de 5 V sinon on pourrait endommager le port parallèle de l'ordinateur. Afin de simuler un signal, on peut brancher la borne 15 à un pull-up de 5 V, le port parallèle croit donc que le système est stimulé en permanence.

3.2 Visualisation d'une mesure

Il est possible de vérifier un enregistrement à l'aide du programme Matlab *visusig.m*.

```
visusig('nom_de_votre_fichier',no_du_filtre (5, 6 ou 7),
étendue_de_cycle_à_utiliser, affiche le résultat(0=non,
1=oui))
ex : visusig('ra00000l',7,[7 3],1)
```

Cet appel affiche le fichier de mesure nommée *ra00000l.sig* en coupant les 7 premiers et les 3 derniers cycles de mesure. Le graphique supérieur est la tension mesurée alors que le graphique inférieur est le courant. Les courbes mauves sont les mesures expérimentales et les courbes jaunes, les valeurs filtrées à l'aide du filtre 7 (voir le programme *visusig.m* pour la définition exacte des différents filtres).

4 UTILISATION DES PROGRAMMES DE TRAITEMENT DES MESURES AFIN DE DÉTERMINER LES PARAMÈTRES DU MODÈLE BIDOMAINE ANISOTROPE À PARTIR DE L'IMPÉDANCE

4.1 Traitement des mesures expérimentales

Plusieurs traitements sont nécessaires afin de déterminer les résistivités à partir de l'impédance. Un exemplaire des fichiers de traitement suivant se trouve dans le répertoire D:\Experimentation\Exemple du dual pentium III. On doit effectuer les modifications indiquées et exécuter ***tous*** les programmes suivants ***dans cet ordre***.

4.1.1 *batch_process.m*

Ce fichier doit être modifié après chaque séries de mesure, il appelle le programme *proc7_NT.m.* qui filtre entre autres les signaux à l'aide d'un filtre passe bande afin de retirer le bruit et créer un nouveau type de fichier **.map.*

On doit y changer la variable **`date`** ainsi que remplacer les noms des anciens fichiers (**`'nom_fichier'`**) par les fichiers désirés :

```
proc7_NT('nom_fichier',date,filtre,intervalle,'commentaire'
);
```

Le paramètre **`filtre`** peut être 5, 6 ou 7 selon les caractéristiques du filtre que l'on désire utiliser (voir dans le fichier *proc7_NT.m* pour plus de détails sur les filtres possibles). L'**`intervalle`** est l'intervalle de cycle à considérer lors des calculs, ex : [7 3] exclura les 7 premiers et 3 derniers cycles. On peut choisir d'exclure différents

cycles pour différents fichiers si des problèmes techniques sont survenus causant du bruit localisé :

Ex: `proc7_NT('is2aaal',date,7,[7 3],'rien');`

4.1.2 *batch_aut.m*

Ce fichier doit être modifié après chaque séries de mesure, il contient plusieurs variables utilisées par les programmes exécutés par la suite.

Variables à modifier :

`S` Cette variable contient les valeurs des salins mesurées avec le conductivité-mètre et utilisées afin de calibrer la sonde.

`nameSL` Contient les noms des fichiers de mesure dans le salin selon l'orientation longitudinale que l'on désire utiliser afin d'effectuer la calibration dans le salin, nommés selon le même ordre que la variable **`S`**.

`nameST` Contient les noms des fichiers de mesure dans le salin selon l'orientation transverse que l'on désire utiliser afin d'effectuer la calibration dans le salin, nommés selon le même ordre que la variable **`S`**.

`fichiers` Contient les noms des fichiers de mesure dans le salin sans le 'l' ou le 't' à la fin.

`fichier` Contient les noms des fichiers de mesure d'impédance sans le 'l' ou le 't' à la fin.

NB : Tout ce qui se trouve après la ligne:

%%%%%%%%%%%%-----FIN PARAMETRES A MODIDIER-----%%%%%%%%%%%%

doit être mis en commentaire ou retiré.

4.1.3 *batch_corr_aut.m*

Rien à modifier dans ce programme. Ce programme servait originalement à modifier certains bruits localisés pouvant survenir sur les mesures. Cependant, il n'est pas utilisé pour le moment mais on doit quand même l'exécuter car il change le nom des fichiers de **.map* à **.itp*.

4.1.4 *batch_cmp_aut.m*

Rien à modifier dans ce programme. Il appelle le programme *cmpflt5NT.m* qui effectue la calibration des résultats pour différents plaquages en utilisant les fichiers de mesure dans le salin. Crée les fichiers **.cmp*.

4.1.5 *batch_merge_aut.m*

Rien à modifier dans ce programme. Il appelle *merge_aut.m* qui fusionne les fichiers d'orientations longitudinale et transverse ensemble et change l'extension en **.mrg*.

4.1.6 *batch_f2400_aut.m*

Rien à modifier dans ce programme. Il retire des fichiers **.mrg*, tous les résultats des mesures effectuées à des fréquences supérieures à 2400 Hz pour fins d'utilisation lors du calcul des paramètres du modèle bidomaine anisotrope sans capacité des disques intercalaires (première passe). Si la série de fréquences présente dans '*process.dat*', est modifiée, ce fichier devra être modifié en conséquence afin de retirer les mesures selon les fréquences supérieures à 2400 Hz ou 1000 Hz. Crée les fichiers **.mrg.f2400.*

4.1.7 *batch_fit_aut.m*

Ce programme appelle les programmes qui effectuent l'ajustement («fit») des paramètres proprement dit : il appelle *fit120.m* qui appelle *solvopt.m* qui appelle *fct120.m* qui appelle *bido3d4.exe*. *fct120.m* est la fonction à minimiser appelée par *solvopt.m* qui est le programme d'optimisation, *bido3d4.exe* est le modèle bidomaine proprement dit codé en C.

Certaines variables peuvent être modifiées :

cas1,cas2 Ces variables permettent de définir le modèle à utiliser et les paramètres à fixer, **cas1** correspondant à la première passe et **cas2** à la seconde passe. Elles peuvent prendre plusieurs valeurs. Typiquement, **cas1** sera toujours 'fitRmK' et **cas2** prendra l'une ou l'autre des valeurs suivantes (d'autres valeurs sont possibles, voir le programme *fit120.m* pour plus de détails) :

`fitRmK`

Modèle ne comprenant pas d'impédance de jonction, dont le résultat de R_m est donné en kΩ.

`fitcjLTRmKBeta`

Modèle comprenant une impédance de jonction, dont le résultat de R_m est donné en kΩ.

`fitcjLTRmK_Betafixe`

Modèle comprenant une impédance de jonction, dont le résultat de R_m est donné en kΩ et dont la valeur de β est fixée. Afin de définir la valeur fixée, il faut modifier le programme *fit120.m* à la section suivant la ligne:

```
if strcmp(cas,'fitcjLTRmK_Betafixe')
```

et changer la valeur de β à la ligne :

```
Beta0=
```

`fitcjLTRmK_Nfixe`

Modèle comprenant une impédance de jonction, dont le résultat de R_m est donné en kΩ et dont la valeur de N est fixée. Afin de définir la valeur fixée, il faut modifier le programme *fit120.m* à la section suivant la ligne:

```
if strcmp(cas,' fitcjLTRmK_Nfixe')
```

et changer la valeur de N à la ligne :

```
N0=
```

`fitcjLTRmK_BetaNfixe`

Modèle comprenant une impédance de jonction, dont le résultat de R_m est donné en kΩ et dont les valeurs de N et β sont fixées. Afin de définir les valeurs fixées, il faut modifier le programme *fit120.m* à la section suivant la ligne:

```
if strcmp(cas,'fitcjLTRmK_BetaNfixe')
```

et changer les valeurs de N et β aux lignes suivantes :

```
N0=
Beta0=
```

courbes_seul si = 0, les paramètres du modèle bidomaine optimaux seront calculés et les courbes d'amplitude et de phase de l'impédance en fonction de la fréquence obtenue à l'aide des paramètres optimisés seront tracées;

si = 1, seules les courbes seront tracées en supposant que les paramètres ont été calculés préalablement.

seconde_passe si = 0, le programme calcule les paramètres du modèle en effectuant les deux passes, c'est-à-dire en utilisant le modèle sans et avec capacité des disques intercalaires successivement;

si = 1, calcule seulement le second cas (**cas2**) en supposant que le premier cas (**cas1**) a été calculé préalablement.

4.2 Visualisation des résultats

Plusieurs programmes sont déjà conçus afin de visualiser les résultats.

4.2.1 *courbe_vsuri*.m*

Affiche les courbes d'amplitude et de phase de l'impédance en fonction du temps. Plusieurs paramètres doivent être modifiés directement dans le programme :

`freq1...freq5` contient les numéros des fréquences associées que l'on veut afficher

`fichier` contient les noms des fichiers de mesure d'impédance en ordre d'acquisition.

`x` contient les différents temps d'acquisition, il doit y avoir une correspondance parfaite entre les temps inscrits ici et l'ordre des fichiers de la variable **`fichier`**.

4.2.2 *para_vs_t120*.m*

Affiche les courbes des différents paramètres du modèle bidomaine anisotrope incluant une capacité des disques intercalaires en fonction du temps. Plusieurs paramètres doivent être modifiés dans ce programme :

`fichier` contient les noms des fichiers de mesure d'impédance en ordre d'acquisition.

x contient les différents temps d'acquisition, il doit y avoir une correspondance parfaite entre les temps inscrits ici et l'ordre des fichiers de la variable **fichier**.

4.3 Nomenclature à utiliser pour la création des fichiers de mesure:

Le paramètre *orientation* doit absolument être respecté pour s'assurer du bon fonctionnement des programmes de traitement. Ce qui précède est facultatif.

Fichiers mesurant l'impédance cardiaque :

numéro_étape_heure_orientation.sig

numéro la lettre associée à l'expérience

a -> première expérience

b -> seconde expérience, etc.

étape étape où on est dans le protocole

a -> avant la préocclusion

o -> entre la préocclusion et l'occlusion

i -> pendant l'occlusion

heure hmmss (par rapport à l'étape où on est dans le protocole)

orientation orientation des électrodes utilisées par rapport aux fibres cardiaques

l -> longitudinale

t -> transverse

ex : ja01000t.sig

dixième expérience(j), avant la préocclusion visant à déterminer la zone ischémique (a), mesure prise à 10 minutes avant la préocclusion (01000) selon l'orientation transverse (t)

io01000t.sig

neuvième expérience (i), entre la préocclusion visant à déterminer la zone ischémique et l'occlusion définitive (o), mesure prise à 10 minutes après la préocclusion (01000) selon l'orientation transverse (t)

ji10359l.sig

dixième expérience (j), pendant l'occlusion (i), mesure prise à 1 heure 3 minutes 59 secondes du début de l'occlusion définitive (10359) selon l'orientation longitudinale (l)

Fichiers mesurant dans le salin :

numéro_ typedesalin_quand_orientation.sig

*numéro*la lettre associée à l'expérience

typedesalin la valeur du salin dans lequel on fait les mesures

s15 -> 1,5 mS

s25 -> 2,5 mS

s5 -> 5 mS

quand le temps par rapport au protocole où les mesures de salin sont effectuées

aaa,bbb,ccc -> avant l'expérience

xxx,yyy,zzz -> après l'expérience

orientation rangée d'électrodes utilisées

l -> longitudinale

t -> transverse

ex : as15aaat.sig

première expérience (a), salin 1,5mS (s15), mesures prises avant l'expérience (aaa), électrode transverse (t)